UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MÉLIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS

ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO CONTÍNUA DE HIDROGÊNIO EM
REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

MÉLIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS

**ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO CONTÍNUA DE HIDROGÊNIO EM
REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

AAN637 e Anzola Rojas, Mélida del Pilar
Estratégias para a produção contínua de hidrogênio
em reator anaeróbio de leito fixo / Mélida del Pilar
Anzola Rojas; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos,
2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Produção biológica de hidrogênio. 2. Carga
orgânica volumétrica específica. 3. Reator anaeróbio de
leito fixo. 4. Transferência de massa. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **MELIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS**.

Título da tese: "Estratégias para produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo".

Data da defesa: 05/08/2014

Comissão Julgadora:

Prof. Associado **Marcelo Zaiat (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Edson Luiz Silva**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Associado **José Alberto Domingues Rodrigues**
(Instituto Mauá/IMT)

Prof. Dr. **Luiz Olinto Monteggia**
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS)

Profa. Associada **Magali Christe Cammarota**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Resultado:

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

APROVADO

Protocolado em 19/08/2014
Serviço de Pós-Graduação
EESC/USP

DEDICATÓRIA

À minha esperada
filhinha Valéria e ao meu
namorado Jaime Alberto

AGRADECIMENTOS

Obrigada ...

A Deus pela vida, a saúde e a oportunidade que colocou na minha frente, pelas pessoas que vieram junto com ela e por aquelas que sempre têm estado junto a mim.

Ao Professor Marcelo Zaíat por acreditar em mim, no meu trabalho, nas minhas capacidades, pela orientação e entalhamento dessa minha vida acadêmica e o mais importante pelo tempinho para o café que nunca faltou.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa (Processo de doutorado número 2009/17491-1 e BEPE número 2012/06150-1).

Ao meu namorado Jaime Alberto pela sua inseparável companhia, incondicional carinho e inesquecíveis momentos de felicidade.

Aos meus pais e o meu irmão pela força, motivação e por sempre torcer para que tudo desse certo.

Ao professor Eugénio Foresti pelas oportunas dicas de trabalho e o carinhoso abraço de sempre.

À Maria Angela Adorno (Janja) ... sempre tão disposta e carinhosa.

Aos meus colegas e amigos de laboratório pela colaboração quando precisei, pelas conversas nos corredores do LPB, pelas boas dicas de trabalho Eduardo Penteado (Du), Djalma Ferraz (Dj), Dagoberto Okada (Dago), Priscila Camiloti (Pri), Tiago Palladino, Vivian Carminato.

Às secretárias Pavi e Sá pela colaboração nos processos administrativos.

Aos meus queridos amigos de viagens e aventuras, do dia a dia ... pela sua incondicional amizade, companheiros de risos e choros, Jesús García (Yísus), Marília Horn e Adriana Maluf (Drikinha).

In Belgium, thanks to Heleen De Wever for the supervision and guidance of the research internship, friendly reception and cozy stay.

To Karolien Vanbroekhoven for the acceptance, administrative and locative support to the project development.

To the Engineers, Technicians and Administratives Helmut Elsandar, Silvía Vangeel, Caríne Gielen, Miranda Maesen and Jean-Pierre Luyckx for the collaboration in experimental assembly, analyses and monitoring.

To the colleagues Linsey García-Gonzalez and Doga Arslan for the timely collaboration and guidance at laboratory and at city.

To the secretaries Sofie Sannen and Katrien Vanbroekhoven for the administrative guidance at VITO.

To the friends from far Boeretang Paolo, Salatul, Tanzina, Suman, Daniel, Tím, Agurtzane, Urko, Emre, Vanessa, Xochitl, Bruno, Mohita, Chaví, Nabin, Giussepe and Ángela for the likeable companionship.

RESUMO

Anzola-Rojas M. P. **Estratégias para a produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2014. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo.

O reator anaeróbio de leito fixo tem demonstrado viabilidade para produzir hidrogênio a partir de águas residuárias. No entanto, a liberação do biogás não tem sido contínua devido à diminuição constante da carga orgânica volumétrica específica (COVe) causada pelo acúmulo de biomassa no leito ao longo do tempo. A redução da COVe junto com o envelhecimento da biomassa tem sugerido o estabelecimento de microorganismos consumidores dos constituintes do biogás (H_2/CO_2) responsáveis por cessar a produção de hidrogênio. Neste trabalho, cinco estratégias foram propostas visando a produção de hidrogênio por longo prazo operacional e com estabilidade, mediante a fixação da COVe, as quais incluíram a alteração da estruturação do leito, inverter o escoamento, realizar descartes periódicos de biomassa e variar a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) por meio da variação do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da concentração do substrato. Os resultados demonstraram que a manutenção da COVe em um valor adequado permite a produção contínua de hidrogênio. A ordenação do leito, utilizando polietileno de baixa densidade e espuma, e o escoamento descendente favoreceram a diminuição do acúmulo de biomassa e junto com os descartes de biomassa foi possível manter a COVe em um valor estável próximo de $5 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foi contínua com valor médio de $0,6 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e rendimento (Y_{H_2}) próximo a $0,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$. Por outro lado, o escoamento ascendente e os descartes de biomassa em reator de leito empacotado e ordenado atingiram uma PVH média de $2,2 \pm 0,2$ e $3,13 \pm 0,07 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ quando a COVe foi mantida em 2,6 e 4,4 g sacarose $\text{g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, respectivamente. Por ultimo a variação da COV permitiu manter a COVe entre 3,8 e 6,2 g sacarose $\text{g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, atingindo um Y_{H_2} médio de $2 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$ e um incremento da PVH de 2,4 a $8,9 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durante 60 dias consecutivos. Ainda que com resultados satisfatórios referentes à manutenção por longo período operacional e estabilidade na produção de hidrogênio, a supersaturação deste gás no meio líquido, devido a limitações de transferência de massa, foi a principal causa de perdas de hidrogênio neste tipo de reator.

Palavras-chave: Produção biológica de hidrogênio. Carga orgânica volumétrica específica. Reator anaeróbio de leito fixo. Transferência de massa.

ABSTRACT

Anzola-Rojas, M. P. **Strategies for continuous hydrogen production in fixed-bed, anaerobic reactors.** 2014. Thesis (Ph.D Diploma) - São Carlos School of Engineering - Graduate Program in Hydraulic and Sanitary Engineering, University of São Paulo.

Fixed-bed, anaerobic reactor has been shown to be feasible for hydrogen production from wastewater. However, biogas release has not been continuous due to the continuous specific organic load (SOL) decrease, which in turn is caused by biomass accumulation in the bed, through the time. SOL reduction and biomass ageing have indicated the establishment of the microorganisms that consumes the biogas constituents (H_2/CO_2) as the main cause for ceasing hydrogen production. In this work, five strategies were proposed aiming at obtaining long-term, stable hydrogen production by using SOL maintenance, modifications of the bed structure, flow inversion, periodic biomass discards and diverse organic load rates (OLR), as a function of the hydraulic retention time (HRT) and of the substrate concentration. Results demonstrated that by maintaining the SOL at proper values, continuous hydrogen production can be accomplished. On one hand, structuring the bed by using low-density polyethylene and foam, together with a down-flow and biomass discards were shown to diminish biomass accumulation, which led to keep a stable SOL value close to $5 \text{ g sucrose g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$. Volumetric hydrogen production (VHP) was continuous with an average value of $0.6 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and a yield (Y_{H_2}) close to $0.5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$. On the other hand, up-flow with biomass discharges, when implemented structured-bed and packed-bed reactors reached average VHP values of 2.2 ± 0.2 and $3.13 \pm 0.07 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ as SOL was maintained between 2.6 and $4.4 \text{ g sucrose g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$, respectively. Eventually, SOL was kept between 3.8 e $6.2 \text{ g sucrose g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$ by varying the OLR, thus reaching an average Y_{H_2} value of $2 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$ and a VHP increase from 2.4 to $8.9 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, along sixty consecutive days. As a consequence of mass-transfer limitations, oversaturation of hydrogen at the liquid medium was found as the main factor that causes hydrogen losses concerning fixed-bed reactors, even though the proposed strategies did indeed demonstrate long-term and stable hydrogen production.

Keywords: Biologic hydrogen production, specific organic load, fixed-bed anaerobic reactor, mass transfer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pontos de geração e consumo de hidrogênio no processo fermentativo (CHERNICHARO, 1997; SPEECE, 1996)	37
Figura 2 – Rotas metabólicas envolvidas na produção fermentativa de hidrogênio (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).	39
Figura 3 – Reator biológico do tipo anaeróbio de leito fixo para produção de hidrogênio usado no laboratório de processos biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP).	47
Figura 4 – Produção de acetato a partir da glicólise. Dois terços de acetato são produzidos diretamente dos açúcares, enquanto um terço é produzido pela via <i>Acetyl-CoA Wood-Ljungdahl</i> - homoacetogênese (DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002)	55
Figura 5 - Rota metabólica Acetil-CoA Wood-Ljungdahl utilizada, quer para produção de ácido acético, quer para síntese celular (DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002).	55
Figura 6 – Esquema geral do desenvolvimento experimental. Estratégias 1, 2, 3 e 4 baseadas no controle da biomassa e estratégia 5 no controle da COV.	59
Figura 7 – Configuração do reator anaeróbio de leito fixo utilizado para produção de hidrogênio (a) com leito ordenado (b) com leito empacotado (c) escoamento descendente (d) escoamento ascendente.	62
Figura 8 – Materiais suporte para adesão da biomassa (a) e (b) polietileno de baixa densidade (c) carvão vegetal (d) argila expandida	63
Figura 9 – Materiais suporte para adesão da biomassa (a) polietileno de baixa densidade (b) espuma de poliuretano (c) cerâmica	64
Figura 10 – Montagem experimental dos reatores de leito empacotado	81
Figura 11– Concentração de dextrana em função do tempo em reatores com leito empacotado livres de biomassa. Leitos: (●) polietileno de baixa densidade (■) carvão vegetal (▲) argila expandia	82
Figura 12 – Resposta ao estímulo degrau em reatores com leito ordenado livres de biomassa. Concentração (C) em relação ao tempo (t); (△) Leito de polietileno; (○) Leito de espuma; (◇) leito de cerâmica	84
Figura 13 – Curva E em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente livre de biomassa (—) leito de polietileno; (—) leito de espuma; (—) leito de cerâmica.	85
Figura 14 – Produção temporal de biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descarte de biomassa; (a) polietileno; (b) espuma; (c) cerâmica	87
Figura 15 – Eficiência de conversão de sacarose Es em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (a) polietileno (b) espuma (c) cerâmica	89
Figura 16 – Acúmulo de biomassa no fundo dos reatores de leito ordenado operado com escoamento descendente	90

Figura 17 – Vazão mássica da biomassa de arraste w_x em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (a) polietileno (b) espuma (c) cerâmica	91
Figura 18 – COVe ao longo do tempo em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	100
Figura 19 – Evidências fotográficas de biomassa flutuando no topo do reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente, operado com TDH de 2 h e concentração de substrato de 2 g DQO L ⁻¹	105
Figura 20 – Carga orgânica volumétrica específica (COVe) estimada a partir da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do primeiro descarte de biomassa em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente	109
Figura 21 – Crescimento e retenção de biomassa no leito empacotado ao longo do tempo	109
Figura 22 – Descartes frequentes de biomassa em reator anaeróbio de leito empacotado. Concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e volume total descartado (V)	110
Figura 23 – Comparativo da COVe real e estimada em reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente com descartes de biomassa e COVe observada por Anzola-Rojas et al. (2014) em reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente sem descartes de biomassa	111
Figura 24 – Desempenho de reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes periódicos de biomassa (●). Desempenho de reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente sem descartes periódicos de biomassa (●) (Anzola-Rojas et al, 2014). Produção volumétrica de hidrogênio (PHV); rendimento de hidrogênio (YH ₂); eficiência de conversão de sacarose (Es).	112
Figura 25 – Carga orgânica volumétrica específica (COVe) estimada a partir da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do primeiro descarte de biomassa em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento ascendente	118
Figura 26 - Descartes frequentes de biomassa em reator anaeróbio de leito ordenado. Concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e volume total descartado (V).	119
Figura 27 - Comparativo da COVe estimada com a COVe real em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa e COVe real em reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes de biomassa observada na estratégia 3	120
Figura 28 – Desempenho de reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes periódicos de biomassa (▲). Produção volumétrica de hidrogênio (PHV); rendimento de hidrogênio (YH ₂); eficiência de conversão de sacarose (Es).	121
Figura 29 – Perfil temporal da eficiência média de conversão de sacarose (Es) vazão ($Q_{\text{biogás}}$) e composição de biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	126
Figura 30 – Comportamento temporal da COVe (—) em relação à variação da COV (—) em reator anaeróbio, leito ordenado e escoamento descendente	129

Figura 31 – Perfil temporal da produção de hidrogênio e COVe em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente. Produção volumétrica de hidrogênio (PVH); rendimento de hidrogênio (YH2).....	131
Figura 32 – Tendência da produção de hidrogênio em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente e variação da COV (a) PVH (b) YH2	132
Figura 33 - Distribuição percentual dos PSF em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV (a) PSF principais; (b) PSF secundários	133
Figura 34 – Porcentagem de ácido acético formado pela via homoacetogênica em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	135
Figura 35 – Distribuição percentual do hidrogênio teórico em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV.....	135
Figura 36 – Vazão molar de hidrogênio teórico vH2 em relação à concentração de substrato afluyente Cs0 em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente.....	136
Figura 37 – Porcentagem de vazão molar de hidrogênio liberado e homoacetogênese em relação à vazão molar de hidrogênio teórica	137
Figura 38 – Fotografia da superfície líquida do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV (a) reator com 35 dias de operação, TDH de 2 h, concentração de substrato de 2 g DQO L ⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ e COVe de 15 g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹ (b) reator com 121 dias de operação, TDH de 4 h, concentração de substrato de 4 g DQO L ⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ e COVe de 4,1 g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹	137
Figura 39 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 1	146
Figura 40 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 2	146
Figura 41 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 3	147
Figura 42 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 4	147
Figura 43 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 5	148
Figura 44 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 6	148
Figura 45 – Velocidade da Reação 17 (Sacarose a ácido butírico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV.....	149
Figura 46 – Velocidade da Reação 18 (Sacarose a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV.....	149

Figura 47 – Velocidade da Reação 19 (Sacarose a ácido propiônico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	149
Figura 48 – Velocidade da Reação 20 (Sacarose a ácido láctico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	150
Figura 49 – Velocidade da Reação 21 (Ácido láctico a ácido propiônico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	150
Figura 50 – Velocidade da Reação 22 (Ácido butírico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	150
Figura 51 – Velocidade da Reação 23 (Ácido propiônico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	151
Figura 52 – Velocidade da Reação 24 (Ácido láctico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	151
Figura 53 – Velocidade da Reação 25 (Sacarose a etanol) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas dos materiais usados no leito empacotado (FERNANDES, 2008)	63
Tabela 2 – Características físicas dos materiais usados no leito ordenado (PEIXOTO, 2011)	65
Tabela 3 – Micronutrientes adicionados ao meio sintético por cada 1 g DQO L ⁻¹ (DEL NERY, 1987)	65
Tabela 4 – Análises realizadas durante o tempo experimental e a frequência	73
Tabela 5 – Resultados dos ensaios hidrodinâmicos e porosidade dos leitos empacotados	82
Tabela 6 – TDH médio e padrão de escoamento em reatores de leito ordenado e escoamento descendente	85
Tabela 7 – Vazão máxima e média de biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, operado com e sem descartes de biomassa	86
Tabela 8 – Porcentagem média da composição do biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	88
Tabela 9 – Eficiência média de conversão de sacarose em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	88
Tabela 10 – Vazão mássica média da biomassa de arraste em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	90
Tabela 11 – Produção média dos PSF em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa durante a fase de estabilidade	92
Tabela 12 - Balanço de carbono em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	92
Tabela 13 – Valores máximos de produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (fase transiente)	93
Tabela 14 – Valores médios de produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (fase de estabilidade)	93
Tabela 15 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado com descartes de biomassa	94
Tabela 16 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado sem descarte de biomassa	95
Tabela 17 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. Es em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	96
Tabela 18 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. PVH em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	96

Tabela 19 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. YH2 em reator anaeróbio de leito ordenado escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	97
Tabela 20 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. Produção de ácido propiônico em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	97
Tabela 21 – Faixa da COVe e COVe média na fase transiente em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	101
Tabela 22 – Faixa da COVe e COVe média na fase de estabilidade em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	101
Tabela 23 – Percentagem de ácido acético gerado via homoacetogênese em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	104
Tabela 24 – Porcentagem da vazão molar de hidrogênio vH2 liberada em relação à teórica durante a fase de estabilidade em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa	104
Tabela 25 – Estimativa da biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente	110
Tabela 26 – Desempenho de reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade.....	113
Tabela 27 – Concentração média dos produtos solúveis da fermentação em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade	114
Tabela 28 – Balanço da DQO em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade.....	114
Tabela 29 – Ácido acético gerado via homoacetogênese em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade.....	115
Tabela 30 - Percentagem da vazão molar de hidrogênio vH2 liberada em relação à teórica em reator anaeróbio de leito fixo, usando polietileno como material suporte	115
Tabela 31 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa	119
Tabela 32 – Desempenho de reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa.....	122
Tabela 33 – Concentração média dos produtos solúveis da fermentação em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa	123
Tabela 34 – Balanço da DQO em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa.....	123
Tabela 35 – Ácido acético gerado via homoacetogênese e percentagem da vazão molar de hidrogênio liberado em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa.....	124

Tabela 36 – Desempenho médio de reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	125
Tabela 37 – Produção média dos PSF principais em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	127
Tabela 38 – Produção média dos PSF secundários em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	128
Tabela 39 - Balanço de carbono em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	128
Tabela 40 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	129
Tabela 41 - COVe média estimada em cada fase operacional em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descende e variação da COV	130
Tabela 42 – Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV	130
Tabela 43 – Percentagem vazão molar de hidrogênio vH_2 liberada em relação ao teórico em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e com variação da COV	135
Tabela 44 – Concentração de sacarose ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional	139
Tabela 45 – Concentração de etanol ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional	139
Tabela 46 – Concentração de ácido butírico ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional.....	139
Tabela 47 - Concentração de ácido láctico ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional.....	140
Tabela 48 - Concentração de ácido propiônico ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional.....	140
Tabela 49 - Concentração de ácido acético ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional.....	140
Tabela 50 – Constantes cinéticas	145

LISTAS DE SÍMBOLOS

Desempenho do reator

Símbolo	Parâmetro	Unidade
COV	Carga orgânica volumétrica	g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ ou g sacarose L ⁻¹ d ⁻¹
$COVe$	Carga orgânica volumétrica específica	g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹
DQO	Demanda química de oxigênio	mg L ⁻¹
DQO_{af}	DQO afluente	mg L ⁻¹
DQO_{H_2}	DQO envolvida na produção de hidrogênio	mg L ⁻¹
DQO_{SE}	DQO da sacarose efluente	mg L ⁻¹
$DQO_{t(PSF)}$	DQO total teórica dos produtos solúveis da fermentação	mg L ⁻¹
DQO_x	DQO da biomassa	mg L ⁻¹
E_s	Eficiência de conversão de sacarose	%
F_m	Fator de calibração do medidor	
n	Número de mols	mols
PVH	Produção volumétrica de hidrogênio	L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹
R	Constante universal dos gases ideais	L atm K ⁻¹ mol ⁻¹
Q	Vazão do líquido	L h ⁻¹
$Q_{biogás}$	Vazão de biogás	mL h ⁻¹ ou mol h ⁻¹
CS_0	Concentração de sacarose afluente	mg L ⁻¹
CS	Concentração de sacarose efluente	mg L ⁻¹
T	Temperatura absoluta	K
TDH	Tempo de detenção hidráulica	h
v_{H_2}	Vazão molar de hidrogênio	mmol h ⁻¹
v_s	Velocidade de conversão de sacarose	mmol h ⁻¹
V_i	Volume de gás injetado	mL ou L
V_m	Volume de gás marcado pelo medidor	mL ou L
Y_{H_2}	Rendimento de hidrogênio	mol H ₂ mol ⁻¹ _{sc}
$Y_{x/s}$	Coeficiente de rendimento celular	g SSV g ⁻¹ _{sc}

Carga orgânica volumétrica específica

Símbolo	Significado	Unidade
d	Quantidade de SSV por descarte do fundo do reator	g
s_c	Substrato total consumido	g
SSV_e	Concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente	g L ⁻¹
Q_s	Vazão do substrato	g h ⁻¹
$Q_{\dot{w}}$	Vazão mássica de biomassa produzida	g SSV h ⁻¹

Carga orgânica volumétrica específica

Símbolo	Significado	Unidade
x_a	Sólidos suspensos voláteis aderidos e intersticiais no material suporte	g
x_d	Total de sólidos suspensos voláteis dos descartes realizados durante todo o tempo operacional	g
x_e	Total de sólidos suspensos voláteis no efluente líquido durante todo o tempo operacional	g
x_n	Concentração de biomassa em um tempo determinado	g SSV L ⁻¹
x_{n-1}	Concentração de biomassa no tempo menos um	g SSV L ⁻¹
x_s	Sólidos suspensos voláteis do líquido drenado do reator no final da operação	g
x_t	Quantidade total de biomassa produzida ao final da operação	g SSV
V_u	Volume útil do reator	L
$\dot{w}_x$	Vazão mássica da biomassa de arraste	g SSV h ⁻¹
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimento celular	g SSV g ⁻¹ _{sc}

Ensaio hidrodinâmicos

Símbolo	Significado	Unidade
C	Concentração	mg L ⁻¹
C_{max}	Concentração máxima	mg L ⁻¹
E	Distribuição do tempo de residência	Adimensional
N	Número de reatores de mistura completa em serie	Reatores
$\bar{\theta}h$	TDH médio	h
σ^2	Variância	
σ_{θ}^2	Variância adimensional	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	29
1.1.	Problema	30
1.2.	Hipóteses	32
1.2.1.	Hipótese Central	32
1.2.2.	Sub-Hipóteses.....	32
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	Objetivo geral	35
2.2.	Objetivos específicos	35
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
3.1.	Processo fermentativo visando a produção de gás hidrogênio	37
3.2.	Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio	39
3.2.1.	Inóculo	40
3.2.2.	Substrato	41
3.2.3.	Carga orgânica volumétrica (COV)	41
3.2.3.1.	<i>Concentração do substrato</i>	<i>41</i>
3.2.3.2.	<i>Tempo de detenção hidráulica (TDH)</i>	<i>43</i>
3.2.3.3.	<i>Carga orgânica volumétrica específica (COVe)</i>	<i>44</i>
3.2.4.	Tipo de reator	45
3.3.	Reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente: resultados obtidos e problemas enfrentados	47
3.3.1.	Material suporte, porosidade do leito e TDH	48
3.3.2.	Influência da relação C/N e C/P	50
3.3.3.	Condições de mistura	51
3.3.4.	Inóculo e pré-tratamentos	52
3.3.5.	Concentração de cálcio.....	53
3.4.	Homoacetogênese	54
3.5.	Considerações finais	57
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1.	Reator	61
4.2.	Material suporte	62
4.2.1.	Leito empacotado	62
4.2.2.	Leito ordenado.....	64
4.3.	Substrato	65

4.4.	Inóculo	66
4.5.	Métodos	66
4.5.1.	Porosidade do leito	66
4.5.2.	Ensaio hidrodinâmico no reator com leito empacotado	66
4.5.3.	Ensaio hidrodinâmico no reator com leito ordenado	68
4.5.4.	Medida de vazão de biogás	69
4.5.5.	Composição do biogás	69
4.5.6.	Determinação dos produtos solúveis da fermentação	70
4.5.7.	Análises e frequência das análises	73
4.6.	Cálculos	74
4.6.1.	Desempenho do reator e produção de hidrogênio	74
4.6.2.	Carga orgânica volumétrica específica (COVe).....	76
4.6.3.	Reações químicas e balanço de carbono	78
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1.	Estratégia 1 - Reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento descendente	81
5.1.1.	Produção de hidrogênio.....	81
5.1.2.	Porosidade e ensaios hidrodinâmicos.....	82
5.1.3.	Conclusões parciais - Estratégia 1	83
5.2.	Estratégia 2 - Reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente	84
5.2.1.	Porosidade e ensaios hidrodinâmicos.....	84
5.2.2.	Desempenho dos reatores operados com e sem descarte de biomassa	86
5.2.3.	Produção de hidrogênio em reatores com leito ordenado	93
5.2.4.	Comparação entre as operações em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa e com diferentes materiais suporte	95
5.2.5.	O comportamento da COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	99
5.2.6.	Homoacetogênese e hidrogênio não liberado em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa	102
5.2.7.	Conclusões parciais - Estratégia 2.....	106
5.3.	Estratégia 3 - Reator anaeróbio com leito empacotado operado com escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa.	108
5.3.1.	Descartes de biomassa.....	108
5.3.2.	Desempenho de reator anaeróbio de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa	111
5.3.3.	Homoacetogênese e hidrogênio não liberado em reator anaeróbio de leito empacotado operado com escoamento ascendente e descartes de biomassa	115

5.3.4.	Conclusões parciais - Estratégia 3.....	116
5.4.	Estratégia 4 - Reator anaeróbio com leito ordenado operado com escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa	118
5.4.1.	Descartes de biomassa.....	118
5.4.2.	Desempenho em reator de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa.....	120
5.4.3.	Conclusões parciais - Estratégia 4.....	124
5.5.	Estratégia 5: Variação da carga orgânica volumétrica (COV) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente.....	125
5.5.1.	Desempenho geral de reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	125
5.5.2.	O comportamento da COVe mediante variação da COV em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente.....	129
5.5.3.	Influência da COVe sobre a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	130
5.5.4.	O TDH e a concentração do substrato em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente	136
5.5.5.	Modelagem matemática do desempenho espacial do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV	138
5.5.5.1.	<i>Reações bioquímicas</i>	141
5.5.5.2.	<i>Velocidades de reação</i>	142
5.5.5.3.	<i>Balanco de massa</i>	143
5.5.5.4.	<i>Constantes cinéticas</i>	145
5.5.5.5.	<i>Concentrações</i>	145
5.5.5.6.	<i>Velocidades de reação ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado</i>	149
5.5.6.	Conclusões parciais - Estratégia 5.....	152
6.	CONCLUSÕES	154
6.1.	Trabalhos futuros	155
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1. INTRODUÇÃO

Devido ao rápido crescimento populacional, industrial e econômico, o consumo de energia está sendo incrementado continuamente. Estima-se um incremento de 50% no consumo de energia mundial de 2005 a 2030, de 462 quatrilhões de Btu para 695 quatrilhões de Btu em 2030 (KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012). Por causa dessa crescente demanda e pela necessidade de combustíveis limpos, muitos estudos têm focado a produção de hidrogênio como carreador de energia devido a sua ampla possibilidade de aplicação além dos aspectos ecológicos (BICAKOVA e STRAKA, 2012). O uso do hidrogênio pode resultar em um sistema de energia sustentável, já que esse combustível pode ser produzido a partir de fontes renováveis e utilizado para geração de energia móvel ou estacionária (KRAEMER e BAGLEY, 2008), substituindo combustíveis fósseis em transporte, moradia, comércio e indústria (DAS e VEZIROGLU, 2001).

Dependendo do processo de obtenção, o hidrogênio pode ser considerado um combustível que causa baixo impacto ambiental, uma vez que sua combustão está livre de gases do efeito estufa além de poder ser facilmente convertido em eletricidade em células a combustível (SUZUKI, 1982; DAS e VEZIROGLU, 2001; BABU, MOHAN e SARMA, 2009).

Atualmente, a produção de hidrogênio a partir de fontes combustíveis não fósseis inclui a eletrólise de água, processos termoquímicos, radiolíticos e biológicos (KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012). Dentre esses processos, a produção biológica a partir do uso de fontes mais baratas, como águas residuárias com quantidades consideráveis de fração orgânica biodegradável, torna-se cada vez mais interessante, visto que essas águas são abundantes e seu tratamento antes da disposição no ambiente é um requisito obrigatório (BABU, MOHAN e SARMA, 2009).

Nos processos biológicos para produção de hidrogênio utilizam-se microorganismos como as bactérias anaeróbias, facultativas, fotossintéticas, cianobactérias e algas verdes. As bactérias anaeróbias e facultativas envolvidas no processo fermentativo são capazes de gerar hidrogênio a partir de fontes ricas em carboidratos (CHEONG e HANSEN, 2007). Além disso, pelo processo fermentativo, o hidrogênio pode ser produzido durante o dia e a noite, com velocidade constante, já que não depende de uma fonte de energia externa como no caso do uso das bactérias fototróficas (ALZATE-GAVIRIA, SEBASTIAN, *et al.*, 2007; DAS,

2009). No entanto, as principais desvantagens da aplicação da tecnologia de hidrogênio pelo processo biológico fermentativo são os baixos rendimentos e as baixas velocidades de produção. A literatura tem reportado rendimentos entre 1 e 2 mol H₂ mol⁻¹ glicose convertida, sendo o valor máximo teórico de 4 mol H₂ mol⁻¹ glicose convertida se todo o substrato fosse convertido em ácido acético e os elétrons não fossem usados para crescimento (KRAEMER e BAGLEY, 2008). Diversas pesquisas estão em andamento, e nos últimos anos, têm sido propostas e estudadas novas abordagens para superar esses inconvenientes (HALLENBECK e GHOSH, 2009; HALLENBECK e GHOSH, 2012).

A literatura descreve vários fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio (WANG e WAN, 2009), sendo a configuração do reator um dos mais importantes que influi no rendimento global do processo. Um tipo de reator em particular pode afetar fortemente o processo fermentativo, especialmente por meio da retenção de biomassa, do comportamento hidrodinâmico, da população microbiana que se desenvolve e da efetividade do contato do substrato com os microorganismos (BABU, MOHAN e SARMA, 2009; REN, GUO, *et al.*, 2011).

1.1. Problema

Recentes estudos desenvolvidos no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP) visam a produção de hidrogênio por processo fermentativo em reator anaeróbio de leito fixo a partir de águas residuárias. Nesse tipo de reator, vários fatores que influenciam o processo têm sido analisados tais como: material suporte, porosidade do leito, tempo de detenção hidráulica (TDH) (FERNANDES, 2008), relação carbono/nitrogênio (relação C/N) (ANZOLA-ROJAS, 2010), condição de mistura (LIMA e ZAIAT, 2012), origem do inóculo e diferentes tipos de pré-tratamento (PENTEADO, LAZARO, *et al.*, 2013) e concentração de micronutrientes, como cálcio (CARMINATO, 2013). Os rendimentos máximos observados superam os 3 mol H₂ mol⁻¹_{sc} (sacarose consumida). No entanto, o processo não é estável e a geração de hidrogênio não é mantida por longos tempos de operação, uma vez que a produção de biogás atinge um ponto de máximo com poucos dias de operação e vai decaindo ao longo do tempo até atingir baixos valores ou mesmo valores nulos de produção.

Os autores citados anteriormente (FERNANDES, 2008; CARMINATO, 2013) têm atribuído essa tendência ao acúmulo excessivo de biomassa no leito do reator, resultando em anomalias físicas tais como alteração no padrão de escoamento (caminhos preferenciais e

zonas mortas) e em diminuição da carga orgânica volumétrica específica (COVe) aplicada ao sistema. Por um lado, zonas estagnadas, caminhos preferenciais e curtos-circuitos levam a graves implicações operacionais, com reflexos negativos na fase líquida e gasosa, já que o biogás produzido pode ficar retido nos interstícios do leito, dificultando sua liberação. Por outro lado, a constante diminuição da COVe pode causar mudanças negativas na estrutura microbiana e nas rotas metabólicas, tais como o desenvolvimento de microorganismos consumidores de H_2 e CO_2 ou a utilização da energia para crescimento e manutenção celular. Baixos valores de COVe, obtidos principalmente pelo acúmulo excessivo de microorganismos no reator, implicam em baixa disponibilidade de compostos orgânicos para os organismos, sendo que alguns que possuem a capacidade de viver heterotroficamente e autotroficamente passam a potencializar a rota autotrófica, com consequente consumo de H_2 e CO_2 (MINTON e CLARKE, 1989; DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002; DRAKE, GÖBNER e DANIEL, 2008). Como um exemplo, está provado que *C. ljungdahlii* pode crescer heterotroficamente com consumo de hexoses e pentoses ou autotroficamente com uso de H_2 e CO_2 ou CO, nesse caso com produção de acetato e metanol (KÖPKE, HELD, *et al.*, 2010). Essa rota foi identificada por Lima e Zaiat (2012) em reator acidogênico de leito fixo alimentado com água residuária a base de glicose e foi responsabilizada pela instabilidade na produção de hidrogênio.

Portanto, o controle sobre a COVe pode ser fator chave para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo, com implicações tanto hidrodinâmicas quanto metabólicas (PAN, ZHANG, *et al.*, 2008; HAFEZ, NAKHLA, *et al.*, 2010; ANZOLA-ROJAS, GONÇALVES, *et al.*, 2014). Aplicar e manter uma COVe adequada em um reator anaeróbio de leito fixo produtor de hidrogênio pode evitar o aumento da competição pelo substrato, quer para formação de produtos solúveis da fermentação relacionados ao consumo de biogás, quer para manutenção e crescimento celular. Sendo assim, o resultado pode ser a produção contínua e estável de hidrogênio ao longo do tempo nesse tipo de reator devido ao equilíbrio alcançado entre as populações microbianas. Assim, este trabalho apresenta cinco diferentes estratégias que visam o controle da COVe mediante a inversão do escoamento, alteração estrutural do leito e variação da carga orgânica volumétrica aplicada em um reator anaeróbio de leito fixo produtor de hidrogênio a partir de água residuária sintética a base de sacarose.

1.2. Hipóteses

1.2.1. Hipótese Central

Com base no contexto apresentado e no estado da arte, levantou-se a hipótese de que é possível a produção contínua e estável de hidrogênio em reatores acidogênicos de leito fixo com controle da carga orgânica específica aplicada (COVe) e das características hidrodinâmicas no reator por meio da manipulação de variáveis operacionais ou da disposição adequada dos materiais suportes no leito.

1.2.2. Sub-Hipóteses

A hipótese central, mais ampla, foi dividida em sub-hipóteses levantadas com base nos aspectos construtivos e operacionais dos reatores acidogênicos, a saber:

Sub-hipótese 1: É possível a produção contínua e estável de hidrogênio em reatores acidogênicos de leito fixo empacotado desde que se controle a COVe por meio da operação com escoamento descendente ou pelo descarte periódico de lodo em reatores com escoamento ascendente. O escoamento descendente facilita a lavagem natural da biomassa excedente em um reator de leito fixo empacotado, permitindo maior controle da COVe. Adicionalmente, a saída do gás contracorrente com a fase líquida facilita a liberação do biogás produzido, principalmente no primeiro segmento do leito, minimizando o contato do hidrogênio com os possíveis microorganismos consumidores.

Sub-hipótese 2: O leito com material suporte ordenado longitudinalmente, em contraposição ao leito empacotado, diminui os interstícios, onde, provavelmente, são estabelecidos os organismos consumidores de biogás. A nova configuração do reator anaeróbio com leito ordenado e escoamento descendente ou ascendente evita o acúmulo de biomassa no leito permitindo um melhor controle da carga orgânica volumétrica específica (COVe). Adicionalmente, o leito ordenado com escoamento descendente permite a saída do gás em contracorrente com a fase líquida, facilitando a liberação do biogás produzido, principalmente no primeiro segmento do leito, minimizando o contato do hidrogênio com os possíveis microorganismos consumidores.

Sub-hipótese 3: A variação da carga orgânica volumétrica aplicada (COV) permite controlar a COVe em um reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente, uma vez que estes parâmetros estão diretamente relacionados e as rotas metabólicas podem ser influenciadas pelo tempo de detenção hidráulica (TDH) ou pela concentração do substrato inicial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal desse projeto foi a avaliação de estratégias operacionais que possibilitem a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo de forma contínua e estável ao longo do tempo.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo empacotado com escoamento descendente.
- Avaliar a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo ordenado e escoamento descendente com e sem descartes de biomassa.
- Realizar o controle da COVe em um reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente mediante descartes periódicos de biomassa.
- Realizar o controle da COVe em um reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento ascendente mediante descartes periódicos de biomassa.
- Variar a carga orgânica volumétrica (COV) em um reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente como método para controlar a COVe sem realizar descartes de biomassa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Processo fermentativo visando a produção de gás hidrogênio

A fermentação é um processo complexo que envolve diversas classes de microorganismos e várias fases intermediárias tais como hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Inicialmente, os componentes orgânicos complexos (polímeros) são hidrolisados em compostos mais simples (monômeros). A seguir, os produtos gerados são metabolizados no interior das bactérias fermentativas, sendo convertidos em ácidos orgânicos, álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amoníaco e sulfeto de hidrogênio. Os ácidos orgânicos com mais de dois carbonos são convertidos em acetato e gás hidrogênio pelas bactérias acetogênicas e sintróficas, sendo essas últimas também chamadas de produtoras obrigatórias de hidrogênio (*OHPA – obligate hydrogen producing acetogens*). Finalmente o acetato e o gás hidrogênio são convertidos em metano pelas arqueias metanogênicas (SPEECE, 1996; CHERNICHARO, 1997). Um esquema desse processo é apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Pontos de geração e consumo de hidrogênio no processo fermentativo (CHERNICHARO, 1997; SPEECE, 1996)

Desta forma, quando o objetivo é a obtenção de hidrogênio e ácidos orgânicos, um desequilíbrio é necessário entre as bactérias produtoras (acetogênicas produtoras) e as consumidoras de hidrogênio (acetogênicas consumidoras, arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias redutoras de sulfato) (LEITE, FERNANDES, *et al.*, 2008). No entanto, embora a velocidade de produção de hidrogênio seja dez vezes maior do que a velocidade teórica de produção do metano (HILIGSMANN, MASSET, *et al.*, 2011), o hidrogênio produzido em reatores anaeróbios é rapidamente utilizado pelas consumidoras de hidrogênio.

Contudo, se comparado com o resto de microorganismos, as arqueias metanogênicas contêm pouco número de cepas, que adicionalmente são restringidas por condições muito específicas de crescimento, tais como pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), tipo de substrato, carga orgânica, entre outros (HILIGSMANN, MASSET, *et al.*, 2011). Assim, a variação de algum desses parâmetros, como a operação do sistema com baixo pH (≈ 5.5) ou TDH (≈ 2 e 12 h) pode inibir o desenvolvimento desses microorganismos (CHENG, LIN e CHANG, 2001; KRAEMER e BAGLEY, 2008; REN, GUO, *et al.*, 2008). Por outro lado, a inibição das acetogênicas consumidoras de hidrogênio pode ocorrer mediante a diminuição da pressão parcial do hidrogênio por aspersão de nitrogênio (KIM, HAN, *et al.*, 2006; HUSSY, HAWKES, *et al.*, 2003) ou por remoção do dióxido de carbono (KRAEMER e BAGLEY, 2008).

Pela rota metabólica da glicólise, apenas 33% do hidrogênio disponível no substrato ($12 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ hexose) pode ser atingido por processos fermentativos. Este resultado se deve principalmente às limitações do processo metabólico, pois ainda que existam várias rotas metabólicas para a produção de hidrogênio, somente um terço do substrato pode ser usado para este fim. Os dois terços restantes são utilizados para a formação de outros produtos da fermentação como o acetato, butirato, etanol, acetona, etc. Assim, em termos de crescimento e sobrevivência dos microorganismos, alguns desses produtos, como o acetato, permitem a formação de ATP (energia), enquanto outros permitem a oxidação do NADH necessário para manter o balanço redox da fermentação (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

Como apresentado na Figura 2, basicamente, o açúcar é quebrado a piruvato gerando ATP e NADH. A seguir, o piruvato é convertido em acetil-CoA e dependendo do organismo, o acetil-CoA é convertido a formiato pela rota PFL (*pyruvate: formate lyase*) ou a ferredoxina reduzida e o CO_2 pela rota do PFOR (*pyruvate: ferredoxin oxidoreductase*). Os organismos que desenvolvem somente a rota do PFL não podem usar o NADH para produção de

hidrogênio, o que os limita a produzir unicamente 2 mols de hidrogênio por mol de glicose. O formiato pode ser convertido em hidrogênio e CO_2 pela rota do formiato hidrogênio liase que contém a [NiFe] hidrogenase, ou possivelmente em alguns organismos por uma outra rota que contenha a [FeFe] hidrogenase dependente do formiato (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

Os microorganismos que fazem a rota do PFOR podem potencialmente derivar algum hidrogênio da oxidação do NADH usando uma ou várias [FeFe] hidrogenases. Dependendo da hidrogenase usada, podem ser produzidos de 2 a 4 mols de hidrogênio por mol de glicose (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

Figura 2 – Rotas metabólicas envolvidas na produção fermentativa de hidrogênio (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

3.2. Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio

Da mesma forma que no processo usado para produção de metano, existem muitas variáveis que afetam o processo quando o objetivo é levar a fermentação até a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos. Os principais fatores reportados na literatura estão apresentados a seguir.

3.2.1. Inóculo

A maioria das pesquisas sobre produção de hidrogênio por processo fermentativo envolve bactérias anaeróbias devido a sua elevada velocidade de produção e habilidade para usar uma ampla variedade de carboidratos (KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012). Segundo Wang e Wan (2009) estes microorganismos encontram-se principalmente em ambientes naturais como o solo, lodo proveniente do esgoto doméstico e em processo de compostagem de resíduos sólidos. Alguns estudos reportam o uso do inóculo natural, que consiste no uso das bactérias próprias do substrato a utilizar (ANTONOPOULOU, GAVALA, *et al.*, 2011).

Algumas espécies anaeróbias identificadas pertencem ao gênero *Clostridium*, tais como *C. butyricum*, *C. thermolacticum*, *C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* e *C. saccharoperbutylacetonicum*. Estas espécies são capazes de produzir hidrogênio a partir de carboidratos como glicose, sacarose, hexose e amido. Outras espécies pertencem ao gênero *Enterobacter* e algumas, termofílicas, ao gênero *Thermoanaerobacterium* (WANG e WAN, 2009; KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012).

Muitas dessas bactérias têm sido isoladas visando produzir elevadas quantidades de hidrogênio. Os estudos têm sido levados a cabo em reatores operados em batelada e usando na maioria dos casos glicose como substrato (WANG e WAN, 2009). No entanto, o uso de culturas puras tem limitações práticas em grande escala devido à dificuldade de manter a pureza das culturas em sistemas que usam resíduos como substrato (PAN, ZHANG, *et al.*, 2008).

Por outro lado, o uso de culturas mistas se apresenta mais interessante devido principalmente ao fato de ser mais simples de operar e fácil de controlar em comparação com as culturas puras. Porém, a principal barreira é que o hidrogênio produzido pelas bactérias produtoras de hidrogênio pode ser facilmente consumido pelas consumidoras de hidrogênio. Sendo assim, o inóculo deve sofrer um pré-tratamento que permita inibir as bactérias consumidoras de hidrogênio e ainda preservar a atividade das produtoras de hidrogênio. Dentre os pré-tratamentos encontram-se os métodos de choque térmico, exposição a meios ácidos ou básicos, aeração, congelamento e descongelamento, além de exposição a compostos químicos como clorofórmio, sódio 2-bromoetanosulfonato ou ácido 2-bromoetanosulfônico e iodo propano (WANG e WAN, 2009; REN, GUO, *et al.*, 2008). No caso do inóculo natural a seleção das espécies desejadas depende das condições de operação do reator (ANTONOPOULOU, GAVALA, *et al.*, 2011).

3.2.2. Substrato

A sustentabilidade da produção de hidrogênio por processo fermentativo depende muito do meio de cultivo utilizado, uma vez que a eficiência geral do processo depende das propriedades físico-químicas desses meios. Adicionalmente, o meio deve reunir características tais como ter um elevado conteúdo de carboidratos e ser de baixo custo (KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012).

Vários substratos têm sido usados nos estudos de produção fermentativa de hidrogênio, entre eles diferentes açúcares (como glicose, sacarose, frutose, xilose e lactose) e outros meios mais complexos como resíduos industriais ricos em matéria orgânica (WANG e WAN, 2009). Os estudos incluem materiais como resíduos orgânicos, esgoto doméstico, vinhaças de várias origens, resíduos alimentícios, resíduos de agricultura, efluentes da indústria de azeite de oliva, milho, arroz, mandioca, laticínios, papel, açúcar, amido, óleo de palma e outras fontes de matéria orgânica (KAHYAOĞLU, ŞAHİN e SAKA, 2012).

Embora alguns destes substratos na forma pura não sejam ideais para a produção de hidrogênio devido a sua complexidade, se realizado algum tipo de pré-tratamento passam a ser facilmente utilizados pelas bactérias produtoras de hidrogênio. O ultrassom, acidificação, congelamento e descongelamento, esterilização e micro-ondas são métodos de pré-tratamento comumente usados para tal fim (WANG e WAN, 2009).

3.2.3. Carga orgânica volumétrica (COV)

Vários trabalhos apontam que um fator chave para a produção de hidrogênio é a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) (KIM, HAN e SHIN, 2006; HAFEZ, NAKHLA, *et al.*, 2010; SHEN, BAGLEY e LISS, 2009). Porém, a COV é um fator dependente da concentração do substrato e do tempo de detenção hidráulica (TDH). Assim, a variação destes parâmetros separadamente pode afetar os sistemas produtores de hidrogênio de forma diferente como apresentado a seguir:

3.2.3.1. *Concentração do substrato*

Tem sido demonstrado que o incremento da concentração do substrato, com consequente aumento da COV, pode melhorar a habilidade das bactérias produtoras de hidrogênio durante o processo fermentativo. No entanto, concentrações muito elevadas podem inibir o sistema por sobrecarga ou mudanças nas rotas microbianas. Na literatura têm-se

muitos desacordos entre a faixa adequada, pois existem diferenças operacionais entre os estudos tais como o inóculo empregado, faixas de concentração do substrato abrangidas e tipo de reator (WANG e WAN, 2009).

Nos exemplos apresentados a seguir foi observado que o aumento da concentração do substrato resultou em aumento na velocidade de produção de hidrogênio. No entanto, em ambos os casos o limite superior da COV foi indicado pela inibição do sistema, causada pelo excesso do substrato. Hafez et al. (2010) avaliaram a influência da COV entre 6,5 e 206 g DQO L⁻¹ d⁻¹ mediante a variação da concentração do substrato (glicose entre 2 e 64 g DQO L⁻¹) e TDH de 8 h em um reator de agitação contínua acoplado a um clarificador. Os autores observaram um incremento na velocidade de produção de hidrogênio de 10 a 185 L H₂ d⁻¹ com um rendimento estável de 2,8 mol H₂ mol⁻¹ glicose consumida quando a COV foi entre 6,5 e 103 g DQO L⁻¹ d⁻¹. No entanto, quando a COV foi superior a 103 g DQO L⁻¹ d⁻¹ notou-se uma queda de aproximadamente 60% na velocidade (60 L H₂ d⁻¹) e 50% no rendimento (1,1 mol H₂ mol⁻¹ glicose consumida). Estas observações foram atribuídas a uma inibição causada por excesso de substrato quando a concentração foi de 48 e 64 g DQO L⁻¹ (COV de 154 e 206 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente), uma vez que a eficiência de conversão de glicose caiu de cerca de 100% para 44% e 60%, respectivamente.

Similarmente, em um reator de membrana, Shen, Bagley e Liss (2009) variaram a concentração do substrato entre 1 e 10 g DQO L⁻¹ (COV de 4, 6, 13, 22 e 30 g DQO L⁻¹ d⁻¹) mantendo o TDH em 8 h. Um comportamento similar ao anterior foi observado neste trabalho, em que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 0,02 a 0,20 mol H₂ L⁻¹ d⁻¹ quando a COV passou de 4 a 22 g DQO L⁻¹ d⁻¹. No entanto, o rendimento manteve-se estável em 1 mol H₂ mol⁻¹ glicose consumida até uma COV de 13 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e mostrou um notável incremento de até 1,7 mol H₂ mol⁻¹ glicose consumida quando a COV foi de 22 e 30 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Este aumento no rendimento sugeriu uma inibição por excesso de substrato a partir de 22 g DQO L⁻¹ d⁻¹, uma vez que o aumento da velocidade de conversão de glicose diminuiu e não se manteve de forma linear com a velocidade de produção de hidrogênio.

Por outro lado, dependendo dos microorganismos presentes no processo, o elevado aumento da concentração de substrato pode ocasionar mudanças nas rotas microbianas não favoráveis para a produção de hidrogênio. Um exemplo desta afirmação podem ser algumas espécies de *Clostridium* que contém a enzima responsável pela produção de ácido láctico (lactato dehidrogenase). Este ácido não é um produto principal da fermentação pelo *Clostridium*, pois a enzima requer elevadas concentrações de fructose-1,6-bisfosfato para sua

atividade. Neste caso, a disponibilidade de substrato em excesso pode incrementar a concentração intracelular de fructose-1,6-bisfosfato permitindo, assim, a produção de elevadas quantidades de ácido láctico (MINTON e CLARKE, 1989).

Antonopoulou et al. (2011) analisaram a influência da concentração inicial de substrato usando extrato de sorgo doce entre 9,89 e 20,99 g carboidrato L^{-1} (COV entre 109,9 e 233,2 mmol carboidrato $L^{-1} d^{-1}$, respectivamente) em um reator de mistura completa operado com TDH de 12 h. Observou-se um incremento na produção de hidrogênio de 0,7 a 2,8 $L H_2 L^{-1} d^{-1}$ quando a concentração de carboidratos variou de 9,9 a 17,5 g L^{-1} . No entanto, acima de 17,5 g L^{-1} notou-se que existe um limite superior de concentração sob a qual as bactérias mudam seu metabolismo para produção de etanol, diminuindo a produção de hidrogênio.

3.2.3.2. *Tempo de detenção hidráulica (TDH)*

Em alguns sistemas produtores de hidrogênio, como nos reatores anaeróbios de agitação contínua (CSTR), os baixos valores do tempo de detenção hidráulica (TDH) podem ocasionar perdas graves de biomassa, o que é, muitas vezes, negativo para a produção de hidrogênio e para o desempenho dos sistemas em geral.

Arooj et al. (2008) operaram um reator de forma contínua e em bateladas sequenciais utilizando como substrato amido (20 g COD L^{-1}) e variação do TDH¹ entre 18 e 4 h (COV entre 26,7 e 120 g COD $L^{-1} d^{-1}$). Os autores encontraram que em modo contínuo a diminuição do TDH de 18 h para 12 h (COV de 26,7 e 40 g COD $L^{-1} d^{-1}$, respectivamente) causou um decréscimo da concentração dos sólidos suspensos voláteis de 89%, tornando o sistema inviável para produção de hidrogênio. Porém, em um segundo estágio experimental, operou-se o reator de forma não contínua e a variação do TDH indicou mudanças nas rotas microbianas. O maior rendimento foi de 0,51 mol $H_2 mol^{-1}$ glicose adicionada com TDH de 12 h (COV de 40 g COD $L^{-1} d^{-1}$). Entre 18 e 12 h observou-se que o incremento do rendimento de hidrogênio foi acompanhado pelo incremento da produção do butirato e a diminuição do propionato, enquanto que para os TDH entre 9 e 4 h (COV 53,3 e 120 g COD $L^{-1} d^{-1}$) observou-se principalmente incremento na produção de lactato junto com o decréscimo do rendimento de hidrogênio.

¹ Formalmente não é correto o uso de TDH para reatores operados em batelada, ainda que alimentada. No entanto, esse texto reproduz o que comumente se utiliza na literatura e é comum se encontrar valores de TDH calculados para esses reatores principalmente para comparação com operações contínuas. Nesses casos, é calculada uma "vazão média de alimentação", a qual é usada para estimativa desse TDH não convencional. O cálculo da COV para esses reatores está mais consolidada.

Amorim et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicose (2 g L^{-1}) em um reator de leito fluidificado sob TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h (COV entre 17,7 e 116,6 $\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O decréscimo do TDH com consequente aumento da COV levou a produção volumétrica de hidrogênio de 0,08 a $0,97 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estes resultados foram associados a mudanças nas rotas microbianas quando a COV aumentou. Com a diminuição do TDH, a maioria da glicose foi usada para geração de mais produtos solúveis da fermentação favoráveis para a produção de hidrogênio em vez de crescimento e manutenção celular.

É importante ressaltar que os trabalhos que citam a COV como fator importante para a produção de hidrogênio em reatores acidogênicos raramente apresentam o cálculo da COVe que, pelas hipóteses levantadas nesse trabalho, seria o principal e mais importante fator a ser considerado. A escassez de dados de COVe na literatura deriva do fato da dificuldade em se calcular essa variável ou simplesmente pela pouca importância dada a ela pelos pesquisadores. Assim, nesse texto foram citados os trabalhos publicados que apresentaram a COV como fator importante sem o cálculo da correspondente COVe. Esse fator está abordado a seguir.

3.2.3.3. *Carga orgânica volumétrica específica (COVe)*

Os trabalhos anteriores demonstraram que a COV aplicada no processo fermentativo tem influência sobre a velocidade de produção e rendimento de hidrogênio. Contudo, a inibição causada por sobrecarga de substrato e algumas mudanças nas rotas microbianas observadas nas mesmas faixas de COV poderiam estar relacionadas com a quantidade de microorganismos presentes no sistema. Em outras palavras, essas alterações poderiam estar relacionadas com a carga orgânica volumétrica específica (COVe) dada em quantidade de substrato por microorganismos e por tempo (i.e. $\text{g substrato g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$) em sistemas contínuos ou pela relação alimento/microorganismos (relação A/M) dada em quantidade de substrato por quantidade de microorganismo (i.e. $\text{g substrato g}^{-1} \text{ SV}$) em sistemas não contínuos.

Pan et al. (2008) estudaram a influência da relação A/M entre 1 e 10 g SV no substrato $\text{g}^{-1} \text{ SV}$ no inóculo em sistemas não contínuos mesofílicos ($35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e termofílicos ($50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Cada relação F/M foi definida como a quantidade de sólidos voláteis do substrato, no caso resíduos alimentícios, em relação à quantidade de sólidos voláteis no inóculo. No sistema mesofílico, observou-se que a mudança da relação A/M de 1 a 6 g SV no substrato $\text{g}^{-1} \text{ SV}$ no inóculo aumentou lentamente o rendimento de hidrogênio até $39 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$. Logo após,

com maiores relações F/M o rendimento caiu bruscamente até zerar completamente a partir da relação F/M de 8 g SV no substrato g^{-1} SV no inóculo.

Por outro lado, no sistema termofílico, entre a relação A/M de 1 a 5 g g^{-1} , houve aumento na produção de hidrogênio até 57 mL $\text{H}_2 \text{ g}^{-1}$ SV e este se manteve quase constante nesse valor com relações A/M maiores. Um comportamento similar foi observado na composição do biogás em ambos os casos. No sistema mesofílico o conteúdo de hidrogênio no biogás chegou próximo de 35% com relação A/M de 6 g g^{-1} , seguido de uma constante queda com maiores relações A/M, enquanto que no sistema termofílico o conteúdo chegou a 38% com relação A/M de 5 g g^{-1} e se manteve constante até a relação A/M de 10 g g^{-1} (PAN, ZHANG, *et al.*, 2008).

Observou-se que a variação da relação A/M esteve relacionada com o pH do sistema, uma vez que este foi diminuindo conforme a relação A/M aumentou em ambos os sistemas. No sistema mesofílico, com relação A/M de 6 g g^{-1} , o pH chegou a 5,5 seguido de uma abrupta queda até 4,0 com relações maiores, enquanto que no sistema termofílico as melhores relações A/M levaram o pH do sistema até 5,9. Desta forma, os autores concluíram que a variação da relação A/M pode causar mudanças nas rotas microbianas derivadas da variação do pH (PAN, ZHANG, *et al.*, 2008).

Em sistemas contínuos a COVe pode ter influência direta sobre a eficiência de conversão do substrato. Hafez et al. (2010) observaram uma inibição por excesso de substrato que levou a diminuição no rendimento de hidrogênio quando a COVe do sistema foi maior que 6,4 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. Em uma revisão realizada pelos autores observou-se que o rendimento de hidrogênio aumentou de 2,2 para 2,8 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose quando a COVe variou de 2 para 6,4 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. E logo após, notou-se uma severa queda até 1 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose sob uma ampla faixa de COVe entre 8,5 e 20 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, seguida de rendimentos abaixo de 0,8 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose quando a COVe foi de 30 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$ ou maior. Desta forma, sugeriu-se que uma COVe adequada para melhorar a produção de hidrogênio em reatores contínuos CSTR está na faixa de 4,4 a 6,4 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$.

3.2.4. Tipo de reator

Na literatura têm-se estudado diferentes configurações de reatores viabilizando rendimentos mais altos, confiáveis, mais estáveis por longos períodos de tempo e resistentes a flutuações de curto prazo nos parâmetros operacionais, o que segundo Hallenbeck e Ghosh, (2009) tem permitido melhorar as taxas de produção volumétrica. Para otimizações e estudos

iniciais, o reator mais frequentemente usado é o operado em batelada devido à fácil operação e controle. No entanto, para operações em grande escala são requeridos processos de produção contínua por razões práticas de Engenharia (WANG e WAN, 2009).

Os sistemas de reatores contínuos mais comumente usados são os tanques de agitação contínua (*CSTR – Continuous [flow] stirred tank reactor*) principalmente pela mistura homogênea mais eficaz, que além de levar a menores resistências a transferência de massa, permite obter parâmetros operacionais em várias circunstâncias (REN, GUO, *et al.*, 2011). No entanto, nos CSTR a velocidade de crescimento microbiano é controlada pelo TDH que é igual ao tempo de retenção celular (TRC). Sendo assim, o TDH de operação deve ser maior do que a velocidade de crescimento máximo dos microorganismos, visto que valores menores causariam uma diluição e consequentemente a lavagem do sistema (HALLENBECK e GHOSH, 2009).

Uma segunda categoria conceitual de reatores de escoamento contínuo, caracterizado pela retenção física da biomassa microbiana, supera esse problema e oferece diversas vantagens. Nestes reatores o TRC e, consequentemente, a concentração da biomassa são independentes do TDH, o que permite obter melhores velocidades de produção volumétrica do gás, assim como melhor degradação do substrato (BABU, MOHAN e SARMA, 2009; HALLENBECK e GHOSH, 2009). Os reatores de crescimento aderido podem ser de leito fixo ou móvel, sendo que os de leito móvel podem ter vários níveis de expansão, denominados de reatores de leito expandido, até chegar à fluidificação, denominados, nesse caso, de reatores de leito fluidificado.

Em um estudo comparando um CSTR e um reator de leito fluidificado, em sistemas de células suspensas e imobilizadas, a formação de grânulos ou biofilmes melhorou substancialmente a retenção de biomassa que é proporcional à velocidade de produção de hidrogênio. Por outro lado, enquanto no CSTR a lavagem de biomassa pode ocorrer com TDH menores de 2,5 dias, um reator anaeróbio de manta de lodo (*UASB – Up-flow anaerobic sludge bed - UASB*) e um reator de leito fixo podem oferecer melhor desempenho com TDH menores que 1 dia (REN, GUO, *et al.*, 2011).

Existem diversas variações no tipo de reator de escoamento contínuo com retenção de biomassa, seja pela formação de flocos para autoimobilização dos microorganismos, imobilização em materiais inertes ou membranas de retenção celular. No entanto, neste tipo de reatores existe um potencial problema relacionado ao consumo do hidrogênio pelo possível crescimento lento de microorganismos consumidores de hidrogênio (HALLENBECK e GHOSH, 2009), como parece ser o caso do reator anaeróbio de leito fixo utilizado no

Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP), conforme relato a seguir.

3.3. Reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente: resultados obtidos e problemas enfrentados

A produção de gás hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e escoamento ascendente tem sido o foco principal dos pesquisadores do LPB-EESC-USP. Conforme a Figura 3, o reator padrão utilizado nos ensaios consiste em um tubo de acrílico com diâmetro interno de 80 mm e 750 mm de comprimento, perfazendo um volume total de 3,77 L. O leito apresenta comprimento de 50 cm e cinco pontos de amostragem igualmente espaçados para a obtenção de dados de concentração em função do comprimento.

Figura 3 – Reator biológico do tipo anaeróbio de leito fixo para produção de hidrogênio usado no laboratório de processos biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP).

Alguns parâmetros de operação foram fixados durante o desenvolvimento dos experimentos a fim de ter padrões de comparação: A principal água residuária utilizada tem sido a sintética a base de sacarose, com nutrientes adicionados segundo Del Nery (1987). O inóculo é geralmente obtido de forma natural, seguindo método descrito por Leite et al. (2008), segundo o qual o meio de alimentação é deixado em repouso por três dias e, a seguir, recirculado no reator durante uma semana. A temperatura é controlada a 25°C em câmara de climatização. O pH afluente é mantido em 6,5, pois foi comprovado que, logo após a entrada

do meio no reator, este cai para 5,5, valor ótimo para produção de hidrogênio segundo a literatura revisada pelos pesquisadores (VAN GINKEL, SUNG e LAY, 2001).

A seguir são apresentados os trabalhos desenvolvidos no LPB-EESC-USP nas condições descritas no parágrafo anterior. A descrição de tais trabalhos é importante, pois as hipóteses levantadas nesse projeto foram estabelecidas com base nos resultados previamente observados. A instabilidade na produção de hidrogênio ao longo do tempo foi generalizada praticamente em todos os experimentos e a avaliação dos dados obtidos serve como base para a proposição de estratégias que viabilizem a produção contínua e estável de hidrogênio em reatores de leito fixo.

3.3.1. Material suporte, porosidade do leito e TDH

Fernandes (2008) realizou seus experimentos em duas fases; primeiro testou argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade como material suporte para adesão da biomassa e avaliou os TDH de 2 e 0,5 h. Em uma segunda fase avaliou a produção de hidrogênio utilizando leito de polietileno de baixa densidade com diferentes porosidades. A DQO da água residuária sintética foi de 1 g L^{-1} , relação C/N de 63 (gC/gN) e relação carbono/fósforo (C/P) de 163 (gC/gP).

Na primeira fase, a porosidade do leito foi de 39%, 47% e 52% com argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade, respectivamente. O desempenho dos reatores foi avaliado com TDH de 2 horas por 89 dias. O sistema demonstrou capacidade de degradar sacarose com eficiência de conversão de 77% com argila expandida, 91% com carvão vegetal e 84% com polietileno de baixa densidade. O biogás gerado foi composto por H_2 e CO_2 .

Durante o tempo de operação, o rendimento de hidrogênio não apresentou estabilidade, observando-se uma diminuição constante após sete dias de operação até zerar completamente perto do 40º dia. Fernandes (2008) relacionou essa diminuição com as altas velocidades de crescimento microbiano que provocaram alterações no metabolismo e aumentaram a competição por diferentes substratos.

Os valores médios de rendimento foram $3,27 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ na argila expandida, $3,45 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ no carvão vegetal e $3,49 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ no polietileno de baixa densidade. No entanto, no meio líquido houve estabilização na produção de ácido butírico e etanol. Logo após, os reatores foram operados com TDH de 0,5 h durante 43 dias. Nesta condição, o rendimento médio de hidrogênio foi de $4,44 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ com argila expandida, $4,52 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ com carvão vegetal e $4,38 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ com polietileno de baixa densidade.

Embora estes valores fossem superiores aos alcançados com TDH de 2 h, o sistema se caracterizou pela instabilidade e a baixa eficiência de conversão de sacarose.

Tal resultado foi relacionado com o aumento da carga orgânica aplicada, em torno de 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, sendo quatro vezes maior do que com o TDH de 2 h. A instabilidade do processo também foi refletida na formação de ácidos e álcoois. A despeito desses resultados, Fernandes (2008) sugeriu que estas características de operação poderiam ser favoráveis se vários reatores fossem operados em série.

Os resultados de rendimento de hidrogênio entre os materiais suporte operados com TDH de 2 e 0,5 h apresentaram grande similaridade. Desta forma, a avaliação da influência do material suporte sobre a produção de hidrogênio foi baseada no caráter operacional dos reatores. A fragmentação da argila expandida e do carvão vegetal ao longo do processo, o que provocou entupimentos na saída dos reatores, não foi observada para o leito de polietileno de baixa densidade. Portanto, este último material se apresentou como o material mais adequado para adesão da biomassa no reator produtor de hidrogênio.

Na segunda fase de operação, Fernandes (2008) avaliou o polietileno de baixa densidade com porosidades do leito de 50%, 71% e 95% durante 47, 37 e 65 dias, respectivamente. A variação desse tempo esteve relacionada com o rendimento, pois a ausência de produção de hidrogênio no reator com porosidade de 50% foi evidenciada após 30 dias de operação e, com porosidade de 71%, aos 23 dias. O rendimento médio foi de 4,38 mol H₂ mol⁻¹_{sc}, 3,76 mol H₂ mol⁻¹_{sc} e 4,20 mol H₂ mol⁻¹_{sc} para porosidades do leito de 50%, 71% e 95%, respectivamente. O reator com porosidade de 91% apresentou oscilações na produção de hidrogênio, com ciclos de máximo e mínimo sendo obtidos ao longo da operação. Tais oscilações, segundo Fernandes (2008), poderiam estar associadas ao arraste periódico da biomassa excedente do sistema e, conseqüentemente, com as variações na carga orgânica específica aplicada (COVe). Os valores similares de rendimento dos leitos de menor porosidade (50% e 71%) e geração por curto período de tempo foi atribuído à falta de equilíbrio entre o processo de geração e remoção do biofilme. Neste contexto, Fernandes (2008) sugere que o emprego de leitos com maior porosidade poderia evitar a retenção de biomassa nos interstícios o que seria favorável para a produção de hidrogênio.

Godoi (2010) avaliou a espuma de poliuretano como material suporte para adesão da biomassa e ordenou o leito de modo a aumentar a porosidade e evitar a formação de interstícios. Para estruturação do leito foram utilizados cilindros de espuma de poliuretano (aproximadamente de 2 cm de diâmetro e 2,5 cm de comprimento) que foram organizados em

fileiras alternadas por meio de hastes de fixação. O afluente do reator teve DQO próxima de 2 g L⁻¹, relação C/P de 326 e relação C/N de 140.

O reator foi operado continuamente com TDH de 2 h por 60 dias. Os resultados mostraram um comportamento de queda na produção de hidrogênio similar ao observado por Fernandes (2008) e por Anzola-Rojas (2010). Embora o processo de fermentação no meio líquido tenha sido estável, não foi possível determinar uma etapa de estabilização na produção de biogás com diminuição contínua até zerar completamente.

O valor médio de rendimento de hidrogênio foi de 1,2 mol H₂ mol⁻¹_{sc} e o biogás foi composto principalmente por H₂ e CO₂ com porcentagens próximas a 49% e 27%, respectivamente. No entanto, a eficiência média de conversão de sacarose foi de 78%. O ácido acético, o ácido butírico e o etanol foram os principais produtos intermediários. Observou-se arraste de sólidos do reator, atribuído ao desprendimento intermitente de biomassa e polímeros extracelulares do material suporte.

Embora a estratégia de estruturar o leito minimizasse o acúmulo de biomassa intersticial, não houve aumento no rendimento de hidrogênio, nem estabilização na produção de biogás, comparado com Fernandes (2008) e Anzola-Rojas (2010). Provavelmente, esses resultados foram devidos à baixa eficiência de conversão de sacarose, causada pelas perdas de biomassa.

3.3.2. Influência da relação C/N e C/P

Diferentes relações C/N (40, 90, 140 e 190) foram avaliadas por Anzola-Rojas (2010). O material suporte utilizado nestes ensaios foi polietileno de baixa densidade e o leito teve uma porosidade próxima de 60%. As relações C/N se calcularam com base na porcentagem em massa de carbono e nitrogênio dos compostos sacarose (1782 mg L⁻¹) e ureia (8,5 – 40 mg L⁻¹), respectivamente, que constituíram parte do meio.

Os sistemas foram operados continuamente com TDH de 2 h por 60 dias. Em relação à produção de biogás não foi possível diferenciar um período de estabilização nos sistemas, uma vez que houve uma tendência de queda a partir do 25º dia de operação. No entanto, sob todas as relações C/N, a partir do dia 25 de operação, a eficiência de remoção de sacarose (acima de 88%) junto com a geração de metabólitos intermediários (ácidos acético e butírico e etanol) foi estável. O biogás foi composto principalmente por H₂ e CO₂ com porcentagens próximas a 55% e 30%, respectivamente.

Observou-se a influência da relação C/N na produção de biogás, indicando que, quanto maior a relação C/N (menos nitrogênio), maior o rendimento de H₂ com relações C/N até 140. Com relação C/N de 190 observou-se, no entanto, diminuição na produção de biogás com consequente diminuição no rendimento de hidrogênio em comparação com a relação C/N de 140. Os valores médios de rendimento de hidrogênio foram 0,6 mol H₂ mol⁻¹_{sc}, 1,3 mol H₂ mol⁻¹_{sc}, 2,7 mol H₂ mol⁻¹_{sc} e 1,9 mol H₂ mol⁻¹_{sc} com relação C/N de 40, 90, 140 e 190, respectivamente.

Esta influência da relação C/N no rendimento de hidrogênio foi atribuída ao direcionamento da energia. Com excesso de nitrogênio (C/N<140), a energia pode ter sido utilizada principalmente para assimilação e crescimento celular, levando a menores produções de hidrogênio. No entanto, com relação C/N de 190, houve uma deficiência nutricional grave que provocou mudanças na estrutura microbiana e/ou nas rotas metabólicas desfavoráveis para a produção de hidrogênio. Anzola-Rojas (2010) concluiu que existe uma relação C/N ótima próxima de 137 para a produção de hidrogênio.

Como já informado, da mesma forma que Fernandes (2008) e Godoi (2010), Anzola-Rojas (2010) observou diminuição na produção de biogás (H₂ e CO₂) ao longo do tempo após ser atingido o pico de produção por volta do 25º dia operacional. Tal instabilidade foi associada à participação de microorganismos oxidadores de hidrogênio como as bactérias *Knallgas* capazes de usar o CO₂ como fonte de carbono, o H₂ como fonte de energia e o O₂ (proveniente da possível microaeração do sistema) comoceptor final de elétrons.

As hipóteses do consumo de hidrogênio pelos organismos redutores de sulfato ou pelos metanogênicos foram descartadas, pois não explicariam o uso concomitante dos componentes do biogás (H₂ e CO₂), pois não foi detectado metano em nenhuma das análises cromatográficas. A homoacetogênese, embora improvável de ocorrer no pH de operação (4,5), poderia explicar o consumo de H₂ e CO₂, mas levaria ao aumento na produção de ácido acético, o que não foi verificado pelo autor.

3.3.3. Condições de mistura

Lima e Zaiat (2012) variaram diferentes condições de mistura mudando a razão de recirculação (R) entre 0,25 e 2,0. Os reatores foram operados sob as mesmas condições de Anzola-Rojas (2010) e relação C/N de 140 durante 60 dias. A eficiência de remoção de sacarose foi estável a partir do 23º dia de operação com porcentagens próximas a 70%. O biogás produzido foi composto principalmente por H₂ e CO₂, com porcentagem de H₂

próxima a 50% em todas as razões de recirculação. Os valores médios de rendimento de hidrogênio foram $1,14 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$, $1,43 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$, $1,34 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ e $0,86 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ para R de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0, respectivamente.

A variação no rendimento em função da razão de recirculação indicou que o R ótimo para produção de hidrogênio é próximo de 0,6. Lima e Zaiat (2012) afirmaram que o aumento da recirculação até R ótimo melhora a transferência de massa do estado líquido para o estado gasoso facilitando a liberação de hidrogênio. No entanto, o autor discute que condições de mistura mais próximas da mistura completa ($R > 0,6$) podem inibir a formação de todos os intermediários das reações processadas incluindo hidrogênio, ácidos e solventes. Contudo, Lima e Zaiat (2012) também observaram em todos os reatores instabilidade na produção de biogás ao longo do tempo. O autor atribuiu este comportamento à participação de microorganismos consumidores de biogás (H_2 e CO_2) ao longo do leito.

3.3.4. Inóculo e pré-tratamentos

Penteado et al. (2013) avaliaram três diferentes fontes de inóculo: lodo anaeróbio de reator de manta de lodo aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves e de suinocultura e lodo proveniente da autofermentação (inóculo natural). Adicionalmente, analisaram o pré-tratamento ácido e de choque térmico no lodo anaeróbio proveniente dos reatores de manta de lodo. Como material suporte para adesão da biomassa usaram-se aparas de polietileno de baixa densidade empacotadas no leito de cada reator. Os reatores foram operados continuamente por 60 dias com TDH de 2 h e temperatura de 25°C .

Segundo as observações de Penteado et al. (2013), a melhor produção volumétrica de hidrogênio de $62 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ observou-se no reator com lodo anaeróbio de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido e o melhor rendimento de $2,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{sc}}$ observou-se no reator com inóculo natural. O inóculo natural foi o único que não apresentou metano na composição do biogás produzido, demonstrando que a autofermentação pode selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio de forma natural sob as condições experimentais impostas.

Contudo, apesar dos diferentes inóculos e pré-tratamentos, a tendência na produção de biogás foi similar aos demais experimentos descritos neste tópico. Após o tempo transiente definido pela eficiência da conversão de sacarose, o biogás tendeu a diminuir até cessar completamente. Penteado et al. (2013) atribuíram essa queda à elevada pressão parcial que desloca o equilíbrio das reações consumindo o hidrogênio. Por exemplo, uma reação poderia

ser a homoacetogênese que usa o hidrogênio e o dióxido de carbono para sintetizar ácido acético ou a reação entre o hidrogênio e ácido acético que produz etanol.

3.3.5. Concentração de cálcio

A maioria dos trabalhos anteriores (FERNANDES, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010; PENTEADO, LAZARO, *et al.*, 2013) associaram a queda do hidrogênio ao longo do tempo com microorganismos consumidores do biogás, que se estabeleceram no leito empacotado provavelmente devido ao excessivo acúmulo de biomassa ou ao aumento da pressão parcial do hidrogênio. Por outro lado, Godoi (2010) observou que ordenar o leito aumenta a porosidade, consequentemente diminui a colmatação do leito o que seria favorável para a liberação do hidrogênio. No entanto, as observações deste último autor foram desanimadoras ao notar que a saída intermitente de biomassa foi excessiva, prejudicando o desempenho geral do reator.

Dessa forma, uma vez que o cálcio tem sido relatado na literatura como uma exigência estrutural para manter uma elevada concentração de biomassa no reator, Carminato (2013) investigou a influência de diferentes dosagens de cálcio (0,50; 1,06; 1,37; 1,87; 2,45 e 3,61 mg L⁻¹) em um reator de leito fixo ordenado. O leito consistiu na estruturação longitudinal de pequenos cilindros de polietileno de baixa densidade fixados mediante hastes de inox. A porosidade do leito foi de aproximadamente 85%. Os reatores foram operados continuamente por 60 dias, com TDH de 2 h e temperatura de 25°C.

Os resultados mostraram aumento na concentração de biomassa no material suporte com maiores dosagens de cálcio. Tal fato mostrou que a adição de cálcio pôde ser usada como estratégia para melhorar a retenção de biomassa neste tipo de reator. Junto com o aumento da biomassa o maior rendimento médio de hidrogênio chegou a 1,4 mol H₂ mol⁻¹_{sc} e a vazão molar média a 5,4 mmol h⁻¹ quando a concentração de cálcio foi de 1,37 mg L⁻¹. Dosagens de cálcio acima desta concentração causaram crescimento excessivo de biomassa e consequente diminuição na produção de hidrogênio (CARMINATO, 2013).

Uma estimativa matemática sugeriu uma concentração ótima de cálcio de 1,54 mg L⁻¹. Concentrações maiores de cálcio poderiam gerar o crescimento exagerado de biomassa, enquanto concentrações menores poderiam estar abaixo do requerimento nutricional mínimo dos microorganismos. Contudo, a tendência da queda de hidrogênio ao longo do tempo não mudou em nenhuma das seis condições experimentais. Tal fato foi associado por Carminato

(2013) à diminuição constante da carga orgânica volumétrica específica (COVe) ocasionada pelo crescimento e acúmulo constante de biomassa no leito.

3.4. Homoacetogênese

Os experimentos apresentados anteriormente demonstraram viabilidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo. Os fatores avaliados permitiram observar condições para melhorar os valores do rendimento de hidrogênio. No entanto, ainda não foi possível manter a estabilidade e a continuidade na liberação de biogás. As hipóteses levantadas sugerem que este comportamento está relacionado com o estabelecimento de microorganismos consumidores do biogás (H_2 e CO_2) devido ao acúmulo de biomassa no leito.

Anzola-Rojas (2010) e Lima e Zaiat (2012) inferiram sobre o possível estabelecimento de bactérias *Knallgas* (i.e. *Burkholderia* sp.). Este tipo de microorganismos, segundo Gales (2004) pode crescer com H_2 e CO_2 como únicas fontes de energia e carbono, respectivamente, e com O_2 como aceptor de elétrons. Nos experimentos de Anzola-Rojas (2010) e Lima e Zaiat (2012) o O_2 podia estar presente no meio de alimentação ou decorrente da microaeração causada nas juntas de mangueiras. No entanto, esta hipótese foi descartada com as análises de biologia molecular feita por Anzola-Rojas et al. (2014).

Com base nos estudos realizados (ainda não publicados) não se encontrou algum microorganismo relativo às bactérias *Knallgas* e sim possíveis bactérias homoacetogênicas como o *Clostridium carboxidivorans*. As bactérias homoacetogênicas crescem heterotroficamente com diferentes substratos orgânicos ou autotroficamente em uma mistura de H_2 e CO_2 , produzindo principalmente ácido acético (MINTON e CLARKE, 1989). Durante o crescimento das homoacetogênicas heterotróficas em hexoses, dois terços do acetato produzido é formado diretamente a partir dos açúcares (Reação 1), enquanto um terço é sintetizado pela via Acetyl-CoA Wood–Ljungdahl (Reação 2) (Figura 4) (MINTON e CLARKE, 1989; DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002).

A Reação 2 representa o total de síntese de acetato a partir de CO_2 e demonstra que o CO_2 é usado como um aceptor de elétrons gerados na fermentação da glicose (Reação 1) (MINTON e CLARKE, 1989). A redução global do CO_2 para o acetato tem uma variação de energia livre de aproximadamente -100 kJ por mol de acetato sintetizado (DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002)

Figura 4 – Produção de acetato a partir da glicólise. Dois terços de acetato são produzidos diretamente dos açúcares, enquanto um terço é produzido pela via *Acetyl-CoA Wood–Lungdahl* - homoacetogênese (DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002)

A rota metabólica *Acetyl-CoA Wood–Lungdahl* (Figura 5) também pode ser utilizada pelas homoacetogênicas autotróficas para síntese de carbono celular (DRAKE, GÖBNER e DANIEL, 2008).

Figura 5 - Rota metabólica *Acetil-CoA Wood–Lungdahl* utilizada, quer para produção de ácido acético, quer para síntese celular (DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002).

Inicialmente, a redução do CO₂ é catalisada quer pela formatodehidrogenase (ramo metil), quer pela Acetil-CoA sintase (ramo carbonil). Depois, o Acetil-CoA formado pode ser utilizado pela síntese anabólica da biomassa ou convertido a acetato (Figura 5) (MINTON e CLARKE, 1989; DRAKE, KÜSEL e MATTHIES, 2002).

A literatura reporta a evidência da participação de bactérias homoacetogênicas que utilizam H₂ e CO₂ em reatores em batelada produzindo hidrogênio a partir de diferentes substratos. Por exemplo, Oh et al. (2003) observaram, após a fase *lag* de produção de hidrogênio, pressões negativas nas bateladas, remoção total do biogás (H₂ e CO₂) no *headspace* após 130 h e elevadas quantidades de acetato após 230 h. Essa observação levou os autores a realizar experimentos com bicarbonato de sódio como fonte de carbono e hidrogênio como doador de elétrons para constatar a atividade homoacetogênica no inóculo utilizado (OH, VAN GINKEL e LOGAN, 2003). Embora a homoacetogênese tenha sido evidenciada, não foi possível definir se as bactérias mudam de produção de hidrogênio para acetato quando o substrato orgânico acaba, ou se as perdas de hidrogênio são constantes durante a fermentação (OH, VAN GINKEL e LOGAN, 2003; KOSKINEN, KAKSONEN e PUHAKKA, 2007).

A importância da homoacetogênese e o seu efeito sobre o rendimento de hidrogênio não é evidente em reatores contínuos (DINAMARCA e BAKKE, 2009). Vários autores sugerem que a homoacetogênese pode ser inibida pelas limitações termodinâmicas em reatores contínuos (RYAN, FORBES e COLLERAN). No entanto, as observações de Koskinen et al. (2007) em reator contínuo de leito fluidizado, demonstraram mudanças nas populações microbianas e desenvolvimento de prováveis microorganismos homoacetogênicos na formação do biofilme.

Arooj et al. (2008) observaram que, do total de acetato produzido em reatores operados em bateladas sequenciais, $40 \pm 5\%$ foi gerado pela homoacetogênese, indicando que nem sempre a concentração de acetato implica um papel positivo na produção de hidrogênio. Ou seja, parte do hidrogênio que inicialmente é liberado na produção de acetato depois é consumida pelas homoacetogênicas.

Para Calli et al. (2008), os baixos valores de rendimento de hidrogênio a partir de xilose ($1,70 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ xilose}$) e lactose ($3,45 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ lactose}$) em reatores de mistura perfeita (CSTR) poderiam estar relacionados com a elevada pressão parcial do hidrogênio ($>50 \text{ kPa}$), resultando em mudanças nas rotas metabólicas que favorecem o consumo de hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas.

Siriwongrungronson et al. (2007) afirmaram que bactérias homoacetogênicas podem estar presentes em ambientes anaeróbios, tais como o lodo dos reatores usados para o tratamento de esgoto sanitário, o qual é geralmente usado como inóculo de reatores acidogênicos produtores de hidrogênio. Como algumas bactérias homoacetogênicas são formadoras de esporos, o choque térmico, como pré-tratamento do inóculo, é uma técnica ineficiente para sua inibição (KIM, HAN e SHIN, 2006). Dinamarca e Bakke (2009) sugerem que o estabelecimento das bactérias homoacetogênicas está relacionado com o crescimento e a idade do lodo, pois foi observado que o desenvolvimento de biofilme nas paredes e acúmulo de biomassa no reator coincidiu com o decréscimo na produção de hidrogênio e aumento da geração de ácido acético.

3.5. Considerações finais

Os estudos apresentados nessa Revisão demonstram a viabilidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo a partir de águas residuárias. A variação dos diferentes parâmetros tais como TDH, porosidade do leito, relação C/N, condições de mistura, tipo de inóculo e pré-tratamento e concentração de cálcio permitiram melhorar a produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio no sistema. No entanto, estas variações têm sido insuficientes para alcançar uma produção contínua e estável nesse tipo de reator.

Os autores sugerem que o comportamento de queda do hidrogênio durante a fase de estabilização do sistema, definido pela eficiência de conversão de sacarose, se deve à participação de microorganismos consumidores do biogás. Os resultados indicam que o uso do inóculo natural permite a inibição das arqueias metanogênicas mediante as condições experimentais impostas no reator, tais como baixo TDH (2 h) e pH ($\text{pH} < 5,5$). Apesar disso, as estratégias têm sido insuficientes para a inibição de outro tipo de consumidores, como as homoacetogênicas.

As observações dos pesquisadores do LPB-EESC-USP junto com as observações da literatura sugerem que as mudanças nas rotas microbianas podem ter sido causadas pelo acúmulo constante de biomassa no leito do reator. Varias inferências podem ser levantadas a partir dessas observações. Por um lado, o acúmulo de biomassa pode ter gerado uma constante diminuição da carga orgânica volumétrica específica (COVe), o que aumentou a competição pelo substrato inicial forçando ao uso dos produtos intermediários produzidos, como hidrogênio e dióxido de carbono, constituintes do biogás. Por outro lado, o acúmulo pode ter mudado o padrão de escoamento dos reatores, gerando anomalias, como zonas

mortas, onde o biogás produzido ficaria retido. Adicionalmente, essas anomalias poderiam ter diminuído o grau de mistura do reator, diminuindo o efeito de transferência de massa líquido-gás, elevando a pressão parcial de hidrogênio e consequentemente causando mudanças nas rotas microbianas.

Desta forma, no intuito de diminuir o acúmulo de biomassa no leito e manter uma adequada COVe que permita manter a produção de hidrogênio contínua, o seguinte trabalho apresenta cinco estratégias operacionais em um reator anaeróbio de leito fixo. Essas estratégias incluem variar o escoamento descendente e ascendente, ordenar o leito segundo Godoi (2010), Mockaitis (2011) e Carminato (2013), realizar descartes de biomassa e variar a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) mediante a alteração do tempo de detenção hidráulica (TDH) e concentração do substrato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A etapa experimental dividiu-se em cinco diferentes estratégias operacionais, tal como descrito na Figura 6. As estratégias 1 e 2 consistiram em inverter o escoamento de líquido e avaliar a produção de hidrogênio. Estas estratégias junto com a 3 e a 4 se caracterizaram pelo controle da COVe mediante a manipulação da quantidade de biomassa, enquanto a COV se manteve constante em $24 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por último, a estratégia 5 se baseou no controle da COVe por meio da variação da COV mediante a alteração do TDH (2 e 4 h) e do aumento da concentração do substrato (1, 2, 4, 8 e 16 g DQO L^{-1}).

Figura 6 – Esquema geral do desenvolvimento experimental. Estratégias 1, 2, 3 e 4 baseadas no controle da biomassa e estratégia 5 no controle da COV.

As estratégias operacionais adotadas visaram testar a hipótese central desse trabalho e cada uma delas visou testar uma sub-hipótese específica como apresentado a seguir.

A estratégia 1 visou testar a sub-hipótese 1 referente à inversão do escoamento, de ascendente conforme comumente empregado nesse tipo de reator, para descendente. Utilizaram-se três reatores de leito fixo com aparas de polietileno de baixa densidade,

partículas de carvão vegetal e argila expandida como material suporte para adesão da biomassa. Estes materiais foram dispostos no leito de forma empacotada. Os reatores foram operados com TDH de 2 h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹ e escoamento descendente. Embora Fernandes (2008) tenha testado e observado que diferentes materiais suporte não afetaram substancialmente o processo acidogênico, o escoamento descendente poderia trazer alguma informação adicional. A influência do material suporte no processo não está listada nos objetivos desse trabalho de pesquisa, mas pode ser considerado como teste adicional por reproduzir os experimentos de Fernandes (2008) apenas com variação do sentido do escoamento.

A estratégia 2 visou testar a sub-hipótese 2 referente à influência da estruturação do leito. Para esse fim, utilizaram-se três reatores com leito ordenado longitudinalmente e cada um com um material suporte diferente. A estruturação do leito consistiu em ordenar pequenos cilindros de polietileno de baixa densidade, espuma de poliuretano e cerâmica em fileiras alternadas verticalmente e fixadas mediante hastes de inox. Essa estratégia se dividiu em dois estágios diferentes; no entanto, em ambos, o TDH aplicado foi de 2 h, a concentração de substrato de 2 g DQO L⁻¹ e o escoamento descendente. O primeiro estágio consistiu em operar os reatores realizando descartes de biomassa a cada 20 dias. Cada descarte consistiu da retirada de 200 mL de líquido do fundo dos reatores, contendo biomassa sedimentada e acumulada durante o período. O segundo estágio consistiu na operação dos reatores sem descartes de biomassa.

A estratégia 3 visou avaliar a sub-hipótese 1 referente à manutenção da COVe em um valor adequado para a produção contínua de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fixo empacotado com aparas de polietileno de baixa densidade como material suporte para adesão da biomassa e operado com escoamento ascendente, TDH de 2 h e concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹. A manutenção da COVe se realizou mediante descartes programados de biomassa pelo fundo do reator conforme foi ocorrendo o acúmulo de biomassa.

A estratégia 4 visou testar e complementar a sub-hipótese 2. Para este fim, utilizou-se um reator de leito ordenado, com cilindros de polietileno de baixa densidade como material para adesão da biomassa. A operação do reator ocorreu de forma similar à estratégia 3, ou seja, escoamento ascendente, TDH de 2 h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹ e a manutenção da COVe por meio de descartes programados de biomassa pelo fundo do reator conforme foi ocorrendo o acúmulo de biomassa.

A estratégia 5 visou avaliar a sub-hipótese 3 referente ao controle da COVe mediante a variação da COV. Neste caso, utilizou-se um reator de leito ordenado, com cilindros de

polietileno de baixa densidade como material suporte para adesão da biomassa. O experimento consistiu em operar o reator com escoamento descendente, sem descartes de biomassa e com variação da COV a cada 30 dias aproximadamente. Essa estratégia se dividiu em seis fases diferenciadas pela COV. Nas duas primeiras, avaliou-se o TDH de 2 h e as concentrações de substrato de 1 e 2 g DQO L⁻¹, perfazendo uma COV de 12 e 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Nas quatro seguintes fases, avaliou-se o TDH de 4 h e as concentrações de substrato de 2, 4, 8 e 16 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 12, 24, 48 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Vale ressaltar que as estratégias 1, 2, 3 e 4 foram desenvolvidas no LPB-EESC-USP, enquanto a estratégia 5 fez parte do estágio de doutorado desenvolvido no *Flemish Institute for Technological Research (VITO)*, na Bélgica.

4.1. Reator

O estudo foi feito em reatores anaeróbios de leito fixo conforme Figura 7. Cada reator consistiu em um tubo de acrílico de diâmetro interno de 80 mm, diâmetro externo de 88 mm e 810 mm de comprimento perfazendo um volume total de 4,1 L. O nível da água dentro do reator foi fixado mediante sifões adaptados na saída do efluente líquido. Para acumulação e posterior saída do biogás na parte superior do tubo acima do nível da água, deixou-se um compartimento de 50 mm de comprimento como *headspace*. O leito foi separado mediante grades de inox com abertura de aproximadamente 5×5 mm, evitando uma possível flutuação ou afundamento dos materiais suporte. O fundo dos reatores teve forma de cone para facilitar o acúmulo de biomassa e adicionalmente teve uma válvula acoplada para descartes.

A configuração do leito e a direção do escoamento variaram dependo da estratégia a desenvolver. Assim, na estratégia 1 usou-se o reator com leito empacotado (Figura 7b) e o escoamento descendente (Figura 7c). Na estratégia 2 usou-se o reator com leito ordenado (Figura 7a) e escoamento descendente. Na estratégia 3 se usou o reator com leito empacotado e escoamento ascendente (Figura 7d). Na estratégia 4 se usou o reator com leito ordenado e escoamento ascendente e, finalmente, na estratégia 5 usou-se o reator com leito ordenado e escoamento descendente.

Figura 7 – Configuração do reator anaeróbio de leito fixo utilizado para produção de hidrogênio (a) com leito ordenado (b) com leito empacotado (c) escoamento descendente (d) escoamento ascendente.

4.2. Material suporte

O material suporte para adesão da biomassa foi escolhido em função da estruturação do leito. No caso do leito empacotado optou-se pelo uso de materiais reportados em trabalhos anteriores desenvolvidos no LPB-EESC-USP. Já para o leito ordenado optou-se por materiais de fácil manipulação na hora da montagem da estrutura e com características similares aos usados no leito empacotado.

4.2.1. Leito empacotado

Durante a estratégia 1, os materiais usados para adesão da biomassa foram o polietileno de baixa densidade (denominado polietileno ao longo do texto), carvão vegetal (denominado carvão ao longo do texto) e argila expandida (denominada argila ao longo do texto), conforme apresentado na Figura 8a, c e d, respectivamente. Estes materiais foram utilizados anteriormente por Fernandes (2008), porém as partículas de polietileno usadas aqui foram de diâmetro médio menor comparadas com as do trabalho anterior.

A preparação do material consistiu em cortar manualmente o carvão, enquanto que a argila e o polietileno mantiveram o tamanho inicial de fabricação. Os materiais foram submetidos a prévio peneiramento utilizando um Agitador Solotest® (No. 7, serie 0805,

Referência – 1202230) e peneiras com abertura comercial de 12,7 mm, 9,52 mm, 7,93 mm, 6,35 mm e 4,22 mm. Cada um dos materiais foi submetido a agitação constante por 15 minutos. Para empacotar o leito de polietileno foram utilizadas as partículas retidas na peneira de 4,22 mm, resultando em diâmetro médio de 5,3 mm. Para os leitos de carvão e argila, 50% do leito foi preenchido com partículas de diâmetro de 8,7 mm e 50% com 7,1 mm, sendo o diâmetro médio de 7,93 mm.

Durante a estratégia 3, o material usado para adesão da biomassa também foi polietileno (Figura 8b), porém o tamanho médio das partículas foi de 12,70 mm e coeficiente de uniformidade 1,26 (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2011).

Figura 8 – Materiais suporte para adesão da biomassa (a) e (b) polietileno de baixa densidade (c) carvão vegetal (d) argila expandida

Na Tabela 1 encontra-se a caracterização desses materiais realizada pelo Centro de Caracterização de Materiais (CCDM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e reportado por Fernandes (2008).

Tabela 1 – Características físicas dos materiais usados no leito empacotado (FERNANDES, 2008)

Material	Área superficial específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Porosidade (%)
Polietileno de baixa densidade	7,9401	Não se aplica
Carvão vegetal	3,5117	42,5
Argila expandida	1,0778	53,8

4.2.2. Leito ordenado

Para estruturação do leito ordenado se utilizaram pequenos cilindros de polietileno de baixa densidade (polietileno), espuma de poliuretano (espuma) e cerâmica especial à base de sílica aluminosa (cerâmica). Os cilindros de polietileno foram adquiridos da empresa Ambio Engenharia, sediada na cidade de Rio de Janeiro, RJ, a cerâmica do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, SP (DEMa-UFSCar) e os cilindros de espuma foram confeccionados a partir de espuma de colchão D33. Tal como apresentado na Figura 9, cada cilindro media aproximadamente 25 mm de comprimento e 20 mm de diâmetro. A estruturação do leito consistiu em ordenar os cilindros alternadamente por meio de hastes de fixação verticais.

Figura 9 – Materiais suporte para adesão da biomassa (a) polietileno de baixa densidade (b) espuma de poliuretano (c) cerâmica

Na Tabela 2 são apresentadas as características físicas dos materiais determinadas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) usando o Analisador de Sorção de Gás de Alta Velocidade de Quantachrome instruments® – Nova 1000, versão 10.02. e reportadas por Peixoto (2011). A porosidade da espuma foi considerada acima de 95% (RODRIGUEZ, 2010;

OLIVEIRA NETTO, 2011) e da cerâmica próxima de 60%, esta última calculada pelo método de Arquimedes segundo a norma ASTM C373-88 (ASTM INTERNATIONAL, 2006).

Tabela 2 – Características físicas dos materiais usados no leito ordenado (PEIXOTO, 2011)

Material	Área superficial específica (m² g⁻¹)	Densidade (g mL⁻¹)
Polietileno de baixa densidade	7,9448	0,9600
Espuma de poliuretano	11,7881	0,0350
Cerâmica	25,5759	2,5000

4.3. Substrato

Como substrato, foi preparada água residuária sintética a base de sacarose. Durante o desenvolvimento das estratégias 1, 2, 3 e 4, a concentração do substrato foi de 2 g DQO L⁻¹, enquanto que na estratégia 5, a concentração variou de 1 g DQO L⁻¹ a 16 g DQO L⁻¹. Em todas as condições experimentais, a relação carbono/nitrogênio (C/N) se manteve em 140 mediante a adição de ureia, conforme Anzola-Rojas (2010). O cálculo desta relação foi baseado na quantidade em massa de carbono e nitrogênio da sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) e ureia (CH₄N₂O), respectivamente.

A adição de micronutrientes para cada 1 g DQO L⁻¹, baseado na sacarose, foi adaptada de Del Nery (1987), conforme apresentado na Tabela 3. O pH do meio sintético afluyente se manteve entre 6,0 e 6,5 com a adição de bicarbonato de sódio e ácido clorídrico.

Tabela 3 – Micronutrientes adicionados ao meio sintético por cada 1 g DQO L⁻¹ (DEL NERY, 1987)

Componente		Concentração (mg L⁻¹)
Sulfato de níquel	NiSO ₄ .H ₂ O	0,25
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,25
Cloreto férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,125
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .6H ₂ O	1,03
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .2H ₂ O	0,020
Dióxido de selênio	SeO ₂	0,018
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	2,68
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	0,65
Fosfato de sódio dibásico	NaHPO ₄ .2H ₂ O	1,35

4.4. Inóculo

O inóculo foi obtido de forma natural segundo procedimento adaptado de Leite et al. (2008). Em um recipiente, com água de abastecimento público preparou-se meio suficiente para 24 horas de alimentação com concentração de substrato de 2 g DQO L⁻¹. O meio foi deixado em repouso por três dias a fim de favorecer a primeira fermentação natural, obtida mediante o contato de microorganismos presentes no próprio substrato e provenientes da água utilizada. Passado esse período, para imobilização da biomassa no material suporte, essa substância fermentada foi recirculada através do reator por uma semana. Desta forma, a adesão da biomassa ocorreu por contato do líquido com o material suporte.

4.5. Métodos

4.5.1. Porosidade do leito

A medida da porosidade inicial do leito foi realizada conforme a metodologia seguida no LPB-EESC-USP (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; RODRIGUEZ, 2010) antes do início do uso dos reatores, considerando o desenvolvimento do biofilme nulo. No intuito de minimizar os efeitos da porosidade intrínseca dos materiais e de calcular a porosidade efetiva do leito, os diferentes materiais foram imersos em água por 24 horas antes de realizar o ensaio.

Após esse período, os materiais foram dispostos dentro do leito e se adicionou água até cobrir completamente o leito. Posteriormente a água foi drenada. A porosidade foi calculada a partir da razão entre o volume líquido drenado do leito com material suporte e o volume líquido drenado da zona do leito vazio (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; RODRIGUEZ, 2010).

4.5.2. Ensaio hidrodinâmico no reator com leito empacotado

Neste tipo de reator um estímulo na forma de pulso foi realizado, utilizando dextrana azul como traçador (LEVENSPIEL, 2000). Este traçador, segundo reportado na literatura, diminui o efeito de difusão nos materiais suporte e na biomassa devido a seu elevado peso molecular (JIMENEZ, NOYOLA, *et al.*, 1988).

A montagem do experimento consistiu em adequar a vazão para um TDH teórico de 2 h usando água de abastecimento como líquido afluente. Na mangueira do afluente, logo antes

da válvula de entrada do reator, foi aplicado um pulso pontual de 50 mL de dextrana azul em concentração de 2,5 g L⁻¹. Em seguida, a cada três minutos foram coletados, em tubos de ensaio, amostras do efluente líquido (10 mL) durante o período de duas horas. As concentrações de dextrana azul foram medidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 650 nm.

Posteriormente, a partir da curva- resposta (concentração por tempo) e conforme a metodologia descrita por Levenspiel (2000) se traçou a Curva E (normalizada) e calculou-se o TDH médio conforme a Equação 1 e Equação 2, respectivamente.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t).dt} \quad \text{Equação 1}$$

$$\bar{\theta}h = \frac{\int_0^{\infty} t.E(t).dt}{\int_0^{\infty} E(t).dt} \quad \text{Equação 2}$$

Nas quais, E é a distribuição do TDH e $\bar{\theta}h$ o TDH médio.

A representação do padrão de escoamento se realizou pelo modelo dos reatores de mistura completa em série, com cálculo da variância da curva normalizada, segundo as Equações 3 a 5.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{\theta}h)^2 . E(t).dt \quad \text{Equação 3}$$

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}h^2} \quad \text{Equação 4}$$

$$N = \frac{1}{\sigma_{\theta}^2} \quad \text{Equação 5}$$

Nas quais σ^2 é a variância; σ_{θ}^2 é a variância adimensional; e N é o número de reatores de mistura completa em série.

4.5.3. Ensaio hidrodinâmico no reator com leito ordenado

Nos reatores com escoamento descendente, devido ao elevado peso molecular da dextrana não foi possível realizar ensaios hidrodinâmicos de tipo pulso, pois o traçador, pela diferença de densidade, não acompanhava adequadamente o escoamento. O mesmo comportamento foi observado com o cloreto de sódio como traçador. Portanto, optou-se por realizar os ensaios de forma inversa. Encheram-se os reatores com uma solução de cloreto de sódio de 10 g L^{-1} e em seguida realizou-se um estímulo degrau pontual com água limpa mediante o sistema de alimentação do reator.

A montagem do experimento, conforme Peixoto (2008), consistiu em instalar na saída do efluente um vertedor com uma sonda para detecção de condutividade, acoplada a um dispositivo coletor de dados CBL 2TM e a uma calculadora Texas TI-89[®]. Coletaram-se valores durante três vezes o TDH teórico até se estabilizar o valor da condutividade.

Posteriormente, traçou-se a curva-resposta e esta foi normalizada por meio da Equação 1 obtendo como resultado a curva F (F por tempo).

$$F = \frac{C}{C_{max}} \quad \text{Equação 6}$$

Na qual, C_{max} é a concentração máxima observada do traçador.

Como neste caso, a resposta foi obtida de forma inversa, o TDH médio é representado pela área da curva F em vez da área sobre a curva como indicado na metodologia de Levenspiel (2000). Portanto, traçou-se a curva F_i segundo a Equação 7.

$$F_i = 1 - F \quad \text{Equação 7}$$

A curva F_i é transformada na curva E gerando uma resposta idêntica à obtida quando a injeção se dá na forma de pulso segundo a Equação 8.

$$E = \frac{dF_i}{dt} \quad \text{Equação 8}$$

Desta forma, a partir da Curva E, o TDH médio se calculou por meio da Equação 2 e o modelo de reatores de mistura completa em serie segundo a Equação 3 a Equação 5.

4.5.4. Medida de vazão de biogás

No compartimento de saída de cada reator foi acoplado um medidor de vazão de gás on-line milligasCounter, da Ritter® para quantificar o volume de biogás produzido. Cada procedimento de medição da vazão volumétrica de hidrogênio consistiu em anotar o volume do biogás quantificado pelo medidor durante um tempo definido e multiplicado pela fração molar de H₂ (ANZOLA-ROJAS, 2010).

4.5.5. Composição do biogás

Durante as estratégias 1, 2, 3 e 4, a composição do biogás (H₂, CO₂ e CH₄) se determinou por cromatografia gasosa (Shimadzu GC 2021®) segundo a metodologia desenvolvida no LPB-EESC-USP, nas seguintes condições:

Coluna capilar: Carboxen 1010, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,53 mm e espessura da coluna de 0,30 μ m.

Gás de arraste: Argônio.

Temperatura inicial do injetor: 200°C.

Temperatura inicial do detector: 230°C.

Vazão do gás de make up (Ar): 12 mL min⁻¹.

Detector: condutividade térmica.

Volume de amostra: 200 μ L.

Usando uma seringa de trava (VICI *Precision Sampling*), as amostras de biogás foram coletadas diretamente na mangueira de entrada do medidor de vazão de biogás, com a frequência de quatro vezes por semana.

Durante a estratégia 5, a composição do biogás (H₂, CO₂, O₂, N₂ e CH₄) foi determinada por cromatografia gasosa. Usou-se o cromatógrafo CTC Analytics – modelo HTX Pal® equipado com um sistema de detector por condutividade térmica (TCD) e as medições foram feitas segundo metodologia desenvolvida no VITO. Dependendo do gás, as colunas capilares foram:

Para CO₂: Hayesep Q, 80 – 100; 0,25 m 1/8” SS.

Para H₂O: Hayesep N, 80 – 100; 1,00 m 1/8” SS.

Para O₂: Molsieve 5A, 80 – 100; 1,00 m 1/8” SS

Para N₂: Hayesep Q, 80 – 100; 2,00 m 1/8” SS.

Para H₂: Carbosphere, 80 – 100; 2,00 m 1/8” SS.

Usando uma seringa para coleta de gás marca Hamilton[®], as amostras de biogás foram coletadas em um septo instalado logo na mangueira de entrada do medidor de vazão de biogás, quatro vezes por semana.

4.5.6. Determinação dos produtos solúveis da fermentação

Durante as estratégias 1, 2, 3 e 4, utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu GC2010[®] (software *GC Solution*), para as análises de ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), acetona e álcoois (metanol, etanol e n-butanol). Empregou-se o método de “*headspace*” estático desenvolvido no LPB-EESC-USP, que utiliza o ácido crotônico como padrão para os ácidos e o isobutanol como padrão para álcoois e acetona, com as seguintes características cromatográficas:

Coluna HP-INNOWAX: comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme 25 μm .

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura do detector: 280°C.

Razão do Split: 1,0.

Fluxo do gás de arraste (H_2): 30 mL min^{-1} .

Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N_2): 30 mL min^{-1} .

Fluxo do gás da chama (ar sintético): 300 mL min^{-1} .

Volume da amostra injetada: 400 μL .

Seringa de 2,5 mL.

Temperatura da seringa: 90°C.

Temperatura de incubação da amostra: 100°C.

O preparo das amostras foi feito em frascos – padrão de vidro com capacidade de 10 mL, com tampa rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro. Foram adicionados 1 g de NaCl, 2 mL de amostra, 70 μL de solução de isobutanol, 100 μL de solução de ácido crotônico (700 mg L^{-1}) e 200 μL de solução de H_2SO_4 2 mol L^{-1} .

Durante a estratégia 5, a determinação dos ácidos voláteis (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocapróico e capróico) foi realizada usando a técnica de cromatografia gasosa segundo metodologia desenvolvida no VITO. Usou-se um cromatógrafo marca FOCUS GC[®] equipado com detector por ionização de chama (FID),

coluna AT^M® (15 m × 0,53 mm × 12 μm) e sistema de injeção Combi PAL[®] com as seguintes características:

Ciclo: GC – Inj

Seringa: 10 μL

Volume de amostra: 1,0 μL

Volume de ar: 1,0 μL

Velocidade do injetor: 100 μL s⁻¹

Temperatura do forno: 70°C isoterma durante 0,6 min; de 70°C a 110°C com 40°C min⁻¹; de 110°C a 172°C a 5°C min⁻¹

Gás de arraste: Hélio

Temperatura do injetor: 250°C

Modo do injetor: CT Splitless

Fluxo do Split: 16 mL min⁻¹

Tempo do Splitless: 0,6 min

Fluxo constante: 3,3 mL min⁻¹

Temperatura do detector: 250°C

Fluxo do ar: 350 mL min⁻¹

Fluxo do H₂: 35 mL min⁻¹

Fluxo do make-up ou gás auxiliar: 30 mL min⁻¹

A determinação do ácido láctico se realizou por cromatografia gasosa segundo metodologia desenvolvida no VITO. Usou-se um cromatógrafo marca TRACE GC[®] equipado com FID, coluna AT-1[®] (30 m × 0,53 mm × 5 μm) e sistema de injeção Combi PAL[®] com as seguintes características:

Ciclo: HS – Inj

Seringa: 2,5 mL HS

Volume de amostra: 750 μL

Temperatura da incubadora: 60°C

Tempo da incubadora: 10 min

Velocidade do agitador: 300 rpm

Agitador (*on time*): 5 s

Agitador (*off time*): 2 s

Temperatura da seringa: 50°C

Velocidade de preenchimento: 1 mL s⁻¹

Temperatura do forno: 30°C isoterma

Gás de arraste: Helium

Temperatura do injetor: 145°C

Modo do injetor: CT Splitless

Fluxo do Split: 20 mL min⁻¹

Pressão constante: 30 KPa

Temperatura do detector: 155°C

Fluxo do ar: 350 mL min⁻¹

Fluxo do H₂: 35 mL min⁻¹

Fluxo do make-up ou gás auxiliar: 30 mL min⁻¹

A determinação dos álcoois (acetona, metanol, etanol, propanol e butanol) foi feita por cromatografia gasosa segundo metodologia desenvolvida no VITO. Usou-se um cromatógrafo marca FOCUS GC[®] equipado com FID, coluna AT WAX[®] (60 m × 0,32 mm × 1,0 μm) e sistema de injeção Combi PAL[®] com as seguintes características:

Ciclo: HS – Inj

Seringa: 2,5 mL HS

Volume de amostra: 750 μL

Temperatura da incubadora: 60°C

Tempo da incubadora: 10 min

Velocidade do agitador: 300 rpm

Agitador (*on time*): 5 s

Agitador (*off time*): 2 s

Temperatura da seringa: 70°C

Velocidade de preenchimento: 1 mL s⁻¹

Temperatura do forno: 40°C a 3°C min⁻¹

Gás de arraste: Helium

Temperatura do injetor: 145°C

Modo do injetor: CT Split

Fluxo do Split: 10 mL min⁻¹

Fluxo constante: 1,6 mL min⁻¹

Temperatura do detector: 200°C

Fluxo do ar: 350 mL min⁻¹

Fluxo do H₂: 35 mL min⁻¹

Fluxo do make-up ou gás auxiliar: 30 mL min⁻¹

4.5.7. Análises e frequência das análises

Na Tabela 4 são apresentadas as análises realizadas durante o desenvolvimento experimental, tipo de amostra, método e frequência.

Tabela 4 – Análises realizadas durante o tempo experimental e a frequência

Parâmetro	Estratégia	Amostra	Método	Frequência
Vazão de biogás	1, 2, 3, 4 e 5	Biogás	Volumétrico (Medidor de vazão)	4 vezes por semana
Composição do biogás	2, 3, 4	Biogás	GC* (LPB-EESC-USP)	2 vezes por semana
Composição do biogás	5	Biogás	GC (VITO)	2 vezes por semana
Sacarose	2, 3, 4 e 5	Líquido afluente e efluente	Dubois, Gilles, <i>et al.</i> , (1956)	4 vezes por semana
pH	2, 3, 4 e 5	Líquido afluente e efluente	potenciométrico	4 vezes por semana
Demanda química de oxigênio (DQO)	2, 3 e 4	Líquido efluente	APHA (2005)	2 vezes por semana
Demanda química de oxigênio (DQO)	5	Líquido efluente	Kit HACH® (JIRKA e CARYER, 1975)	2 vezes por semana
Ácidos graxos voláteis (AGV)	2, 3, 4	Líquido efluente	GC (LPB-EESC-USP)	2 vezes por semana
Ácidos graxos voláteis (AGV)	5	Líquido efluente	GC (VITO)	2 vezes por semana
Ácido láctico	5	Líquido efluente	GC (VITO)	2 vezes por semana
Álcoois	2, 3, 4	Líquido efluente	GC (LPB-EESC-USP)	2 vezes por semana
Álcoois	5	Líquido efluente	GC (VITO)	2 vezes por semana
Sólidos suspensos voláteis (SSV)	2, 3, 4 e 5	Líquido efluente	APHA (2005)	2 vezes por semana
Sólidos voláteis totais (SVT)	2	Biomassa do fundo dos reatores	APHA (2005)	A cada 20 dias
Sólidos voláteis totais (SVT)	2, 3, 4 e 5	Biomassa suspensa e aderida ao leito	APHA (2005)	Final da operação
Sólidos totais (ST)	2, 3, 4 e 5	Material suporte	APHA (2005)	Final da operação

*GC: Cromatografia gasosa

4.6. Cálculos

A partir dos resultados das análises descritas anteriormente, utilizou-se o Microsoft Excel[®] como ferramenta para realizar os cálculos dos valores máximos, médios e desvio padrão do desempenho geral do reator, produção de hidrogênio, COVe e balanço de carbono.

4.6.1. Desempenho do reator e produção de hidrogênio

Vazão de líquido no reator (Q) em $L\ h^{-1}$:

$$Q = \frac{V_u}{TDH} \quad \text{Equação 9}$$

Na qual, V_u o volume útil do reator em L e TDH o tempo de detenção hidráulica teórico aplicado em h.

Eficiência de conversão de sacarose (E_s) em %:

$$E_s = \frac{(Cs_0 - Cs)}{Cs_0} \cdot 100\% \quad \text{Equação 10}$$

Na qual, Cs_0 é a concentração de sacarose afluyente em $mg\ L^{-1}$ e Cs a concentração de sacarose efluente em $mg\ L^{-1}$.

Velocidade de conversão de sacarose (v_s) em $mmol\ h^{-1}$:

$$v_s = \frac{Q \cdot (Cs_0 - Cs)}{MM_s} \quad \text{Equação 11}$$

Na qual, MM_s é a massa molar da sacarose.

Vazão de biogás ($Q_{biogás}$) em $mL\ h^{-1}$:

$$Q_{biogás} = \frac{V_m \cdot F_m}{t} \quad \text{Equação 12}$$

Na qual, V_m é o volume de gás marcado pelo medidor, F_m é o fator de calibração do medidor obtido por calibração com bolhômetro padrão e t é o tempo da medida.

Distribuição percentual de hidrogênio ($\%_{H_2}$), dióxido de carbono ($\%_{CO_2}$), nitrogênio ($\%_{N_2}$) e metano ($\%_{CH_4}$) no biogás:

$$\%_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n} \quad \text{Equação 13}$$

$$\%_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n} \quad \text{Equação 14}$$

$$\%_{N_2} = \frac{n_{N_2}}{n} \quad \text{Equação 15}$$

$$\%_{CH_4} = \frac{n_{CH_4}}{n} \quad \text{Equação 16}$$

Na qual, n_{H_2} , n_{CO_2} , n_{N_2} e n_{CH_4} correspondem ao número de mols de cada um dos gases contidos no biogás: hidrogênio, dióxido de carbono, nitrogênio e metano, respectivamente. Esse conteúdo foi medido por cromatografia e calculado pelas curvas de calibração do cromatógrafo. O valor de n corresponde ao número de mols totais na amostra de gás injetado, calculado usando a equação dos gases ideais (Equação 17).

$$n = \frac{P \cdot V_i}{R \cdot T} \quad \text{Equação 17}$$

Na qual, P é a pressão de gás em atm, V_i o volume de gás injetado em mL, R a constante universal dos gases ideais e T a temperatura absoluta. Nesse trabalho a pressão foi de 1 atm e a temperatura de 25°C (temperatura absoluta = 298 K).

Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) em mmol h⁻¹:

$$v_{H_2} = \frac{Q_{biogás} \cdot n_{H_2}}{V_i} \quad \text{Equação 18}$$

Rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}) em mol H₂ mol⁻¹_{sc}:

$$Y_{H_2} = \frac{v_{H_2}}{v_s} \quad \text{Equação 19}$$

Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em L H₂ L⁻¹ d⁻¹:

$$PVH = \frac{Q_{\text{biogás}} \cdot \%_{H_2}}{V_u} \cdot \frac{24}{1000} \quad \text{Equação 20}$$

Na qual, $\frac{24}{1000}$ é o fator de conversão de unidades.

4.6.2. Carga orgânica volumétrica específica (COVe)

A COVe é definida como a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) por uma quantidade de biomassa por tempo (g substrato g⁻¹ SSV d⁻¹). Neste trabalho, para o cálculo da COVe em um determinado tempo foi necessário estimar a quantidade de biomassa presente no reator. No intuito de aferir o coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$), ao final de cada operação, realizou-se a medida de biomassa total produzida e o total de substrato consumido. Assim, o cálculo do $Y_{x/s}$ se realizou mediante a Equação 21.

$$Y_{x/s} = \frac{x_t}{s_c} \quad \text{Equação 21}$$

Sendo

$$x_t = x_a + x_s + x_e + x_d \quad \text{Equação 22}$$

Na qual $Y_{x/s}$ é o coeficiente de rendimento celular em g SSV g⁻¹ sacarose consumida (g SSV g⁻¹_{sc}); x_t é a quantidade de SSV total produzido durante o tempo de operação em g; x_a é a quantidade de SSV aderidos e intersticiais no material suporte ao final da operação em g; x_s é a quantidade de SSV do líquido drenado do reator ao final da operação em g; x_e é o total de SSV no efluente líquido durante o período experimental em g; x_d é a quantidade de SSV dos descartes realizados do fundo do reator em g e s_c é o total de substrato consumido durante o período experimental em g.

Para o cálculo do x_a , no final de cada operação após a drenagem, parte do leito foi retirada e lavada com aproximadamente 150 mL de água destilada. A solução de lavagem foi acondicionada em estufa por 24 h a 105 °C e depois em mufla por 0,5 h a 550 °C para calcular os SSV. O material suporte foi seco em uma câmara de aquecimento a 55°C por 48 h. A razão entre os SSV do líquido da lavagem e o peso do material suporte seco multiplicado pelo peso total do material suporte do leito corresponde ao valor do x_a .

x_e foi determinado por meio da integral da vazão mássica da biomassa de arraste em função do tempo segundo a Equação 23.

$$x_e = \int_0^t \dot{w}_x \cdot dt \quad \text{Equação 23}$$

Na qual $\dot{w}_x$ é a vazão mássica da biomassa de arraste em g SSV h⁻¹, que correspondente à concentração de SSV saindo no efluente líquido pela vazão conforme a Equação 24.

$$\dot{w}_x = SSV_e \cdot Q \quad \text{Equação 24}$$

Na qual SSV_e é a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente em g L⁻¹ e Q é a vazão do líquido em L h⁻¹. Do mesmo modo, estimou-se o s_c por meio da integral do substrato consumido em função do tempo segundo a Equação 25.

$$s_c = \int_0^t Q_s \cdot dt \quad \text{Equação 25}$$

Na qual Q_s em g h⁻¹ é a concentração de substrato consumido pela vazão do líquido calculada conforme a Equação 26.

$$Q_s = Q \cdot (Cs_0 - Cs) \quad \text{Equação 26}$$

Após o cálculo do $Y_{x/s}$, estimou-se a vazão mássica de biomassa produzida (Q_w) em g SSV h⁻¹ por meio da Equação 27.

$$Q_w = Q_s \cdot Y_{x/s} \quad \text{Equação 27}$$

Desta forma, a estimativa da biomassa dentro do reator em um determinado tempo foi dada pela Equação 28 quando não houve descartes de biomassa.

$$x_n = \left[\frac{Q_w \Delta t}{V_u} \cdot \left(\frac{x_a + x_s}{x_t} \right) \right] + x_{n-1} \quad \text{Equação 28}$$

Na qual x_n é a concentração de biomassa em um determinado tempo em g SSV L⁻¹ e x_{n-1} é a concentração de biomassa no tempo menos um. Quando o reator foi operado com descartes de biomassa o x_n foi calculado pela Equação 29.

$$x_n = \left[\frac{Q_w \Delta t}{V_u} \cdot \left(\frac{x_a + x_s + x_d}{x_t} \right) \right] + x_{n-1} - \frac{d}{V_u} \quad \text{Equação 29}$$

Na qual, d em g SSV corresponde à quantidade de sólidos suspensos voláteis descartada do fundo do reator. No tempo igual a zero, o x_n foi estimado pela Equação 30.

$$x_0 = \frac{C_{S_0} \cdot Y_{x/s} \cdot V_{in}}{V_u} \quad \text{Equação 30}$$

Na qual V_{in} é o volume em L da substância preparada para iniciar a inoculação natural. Neste trabalho, prepararam-se 45 L de substrato por cada reator. Assim, a COVe em um determinado tempo em g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ se calculou como a carga orgânica volumétrica aplicada (COV) em g sacarose L⁻¹ h⁻¹ dividido pelo x_n segundo Equação 31.

$$COVe = \frac{COV}{x_n} \cdot 24 \quad \text{Equação 31}$$

4.6.3. Reações químicas e balanço de carbono

O balanço de carbono foi realizado com base na DQO afluente e efluente como forma de avaliar se os compostos gerados no reator acidogênico estavam sendo quantificados

adequadamente e para garantir a consistência dos dados obtidos, conforme Equação 32 e Equação 33:

$$DQO_{af} = DQO_{ef} \quad \text{Equação 32}$$

$$DQO_{ef} = DQO_{t(PSF)} + DQO_x + DQO_{SE} + DQO_{H_2} \quad \text{Equação 33}$$

Na qual DQO_{af} corresponde à DQO afluyente; DQO_{ef} à DQO efluente; $DQO_{t(PSF)}$ à DQO teórica dos produtos solúveis da fermentação calculados conforme a Reação 4 à Reação 12; DQO_x à DQO da biomassa, igual ao substrato consumido pelo $Y_{x/s}$; DQO_{SE} à DQO da sacarose efluente conforme Reação 13 e DQO_{H_2} à DQO envolvida na produção de hidrogênio conforme Reação 14.

Ácido acético

Ácido butírico

Ácido propiônico

Ácido valérico/isovalérico

Ácido capróico

Ácido láctico

Reação 9

Etanol

Reação 10

Butanol

Reação 11

Propanol

Reação 12

Sacarose

Reação 13

Hidrogênio

Reação 14

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussão referentes às cinco estratégias propostas neste trabalho conforme exposto na Figura 6. No desenvolvimento experimental de cada estratégia, realizou-se o monitoramento dos parâmetros descritos na Tabela 4, visando avaliar principalmente a produção de hidrogênio ao longo do tempo.

5.1. Estratégia 1 - Reator anaeróbico de leito empacotado e escoamento descendente

5.1.1. Produção de hidrogênio

Os reatores anaeróbios de leito empacotado e escoamento descendente foram operados continuamente por 10 dias com TDH teórico de 2 h e temperatura controlada de 25°C. A montagem experimental é apresentada na Figura 10.

Figura 10 – Montagem experimental dos reatores de leito empacotado

Observou-se produção de biogás nos três reatores. Porém, houve impossibilidade física de quantificação e análise da composição, uma vez que o biogás ficou retido nos espaços intersticiais do leito independentemente do material suporte utilizado. Esse fenômeno foi observado nos três reatores. O biogás foi acumulando até formar uma bolha do tamanho do leito, que causou a diminuição do volume líquido do reator. O problema poderia estar associado à porosidade ou a anomalias no padrão do escoamento dos leitos.

5.1.2. Porosidade e ensaios hidrodinâmicos

Calculou-se a porosidade do leito conforme o método descrito no item 4.5.1. e realizaram-se os ensaios hidrodinâmicos conforme descrito no item 4.5.2. As curvas de concentração em função do tempo são exibidas na Figura 11 e na Tabela 5 os valores encontrados do TDH real e o N.

Figura 11– Concentração de dextrana em função do tempo em reatores com leito empacotado livres de biomassa. Leitos: (●) polietileno de baixa densidade (■) carvão vegetal (▲) argila expandida

Tabela 5 – Resultados dos ensaios hidrodinâmicos e porosidade dos leitos empacotados

Leito	Porosidade do leito (%)	TDH real (h)	N (reatores em serie)
Polietileno de baixa densidade	54	0,68	16
Carvão vegetal	48	1,09	24
Argila expandida	42	1,05	21

Ainda que os ensaios hidrodinâmicos demonstrassem que o escoamento se aproximou mais ao ideal pistonado, os baixos valores do TDH real comparado com o TDH teórico indicaram severas anomalias no padrão do escoamento, como zonas mortas ou caminhos preferenciais (LEVENSPIEL, 2000). A baixa porosidade dos leitos poderia ter causado essas anomalias e dificultado a saída do biogás contracorrente do líquido afluente, tornando inviável

a utilização do reator de leito empacotado e escoamento descendente para produção de hidrogênio.

5.1.3. Conclusões parciais - Estratégia 1

Os resultados observados nesta estratégia invalidaram, em parte, a sub-hipótese 1 deste trabalho, referente à inversão do escoamento em reatores de leito fixo empacotado, não tendo sido possível a produção de hidrogênio neste tipo de reator nas condições ensaiadas.

A produção de hidrogênio é inviável em reatores de leito empacotado e escoamento descendente, usando como material suporte polietileno de baixa densidade, carvão vegetal e argila expandida, uma vez que a baixa porosidade dos leitos impede a saída do biogás produzido, impossibilitando a quantificação e análise.

5.2. Estratégia 2 - Reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente

5.2.1. Porosidade e ensaios hidrodinâmicos

Inicialmente, realizou-se o ensaio de porosidade conforme o item 4.5.1. As porosidades aferidas foram 85% no leito de polietileno de baixa densidade (polietileno), 70% no leito de espuma de poliuretano (espuma) e 72% no leito de cerâmica. Desta forma, comprovou-se que a ordenação do leito aumentou a porosidade em aproximadamente 28%, se comparado com os reatores de leito empacotado.

A seguir, com os reatores livres de biomassa e utilizando cloreto de sódio como traçador foram realizados os ensaios hidrodinâmicos conforme o item 4.5.3. A Figura 12 apresenta as curvas-resposta ao estímulo degrau nos três reatores. Com o auxílio do programa OriginPro 8.0[®], estes dados se normalizaram pelo ajuste sigmoidal de *Boltzmann* e se traçaram-se as curvas E conforme Figura 13.

Figura 12 – Resposta ao estímulo degrau em reatores com leito ordenado livres de biomassa. Concentração (C) em relação ao tempo (t); (△) Leito de polietileno; (○) Leito de espuma; (◇) leito de cerâmica

O TDH médio e o padrão de escoamento foram calculados a partir das curvas E conforme Tabela 6. Observa-se que só no caso do reator com leito de espuma, o TDH real coincidiu com o TDH teórico. Com leito de polietileno, o TDH real foi menor em relação ao leito de espuma e cerâmica, fato que foi atribuído à porosidade nula deste material e

provavelmente à presença de caminhos preferenciais. Contrariamente, a porosidade própria da cerâmica poderia ter ocasionado difusão do traçador atrasando a saída do mesmo, o que foi refletido no atraso do TDH real (JIMENEZ, NOYOLA, *et al.*, 1988). O elevado número N em todos os reatores indicou que o padrão de escoamento se aproximou mais ao pistonado ideal (LEVENSPIEL, 2000).

Figura 13 – Curva E em reator anaeróbico de leito ordenado e escoamento descendente livre de biomassa (—) leito de polietileno; (—) leito de espuma; (—) leito de cerâmica.

Tabela 6 – TDH médio e padrão de escoamento em reatores de leito ordenado e escoamento descendente

Leito	TDH real (h)	N (reatores em serie)
Polietileno	1,71	503
Espuma	2,12	72
Cerâmica	3,14	59

Dessa forma, se comparados os TDH reais dos reatores de leito ordenado com os reatores de leito empacotado, é possível observar que houve uma notável diminuição das anomalias no padrão de escoamento quando os leitos foram ordenados, principalmente usando polietileno e espuma como material suporte.

5.2.2. Desempenho dos reatores operados com e sem descarte de biomassa

Em ambos os estágios, com e sem descartes de biomassa, a ordenação dos leitos e o escoamento descendente mostraram ser viáveis para a produção de biogás conforme apresentado na Figura 14. No primeiro estágio, os reatores foram operados continuamente durante 120 dias realizando descartes de biomassa a cada 20 dias. No segundo estágio, a operação foi contínua durante 90 dias sem realizar descartes de biomassa.

Com e sem descartes, a produção máxima de biogás ocorreu durante os primeiros 40 dias nos reatores com leito de polietileno e espuma (Figura 14a e Figura 14b, respectivamente). Após esse período, a produção diminuiu até aproximadamente um terço do ponto máximo e se manteve contínua até o final com um desvio padrão próximo de 45%.

Já no reator com leito de cerâmica, a produção máxima ocorreu durante os primeiros 20 dias em ambas as operações. No entanto, após esse período com descartes de biomassa a produção diminuiu quase 65% do ponto máximo e se manteve até o final da operação com um desvio padrão de 55%. Neste reator, quando operado sem descartes, a produção de biogás cessou completamente por volta do quinquagésimo dia de operação (Figura 14c).

A partir dessas observações iniciais, o tempo experimental foi dividido em fase transiente e fase de estabilidade. A fase transiente nos reatores com leito de polietileno e espuma corresponde aos primeiros quarenta dias de operação e com leito de cerâmica a os primeiros vinte dias. A fase de estabilidade se iniciou a partir do quadragésimo primeiro dia nos reatores de polietileno e espuma e a partir do vigésimo primeiro dia com leito de cerâmica.

A Tabela 7 apresenta o valor máximo de vazão de biogás e o valor médio durante a fase de estabilidade em ambas as operações, com e sem descartes de biomassa.

Tabela 7 – Vazão máxima e média de biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	$Q_{biogás}$ máximo (mL h ⁻¹)	$Q_{biogás}$ média (mL h ⁻¹)	$Q_{biogás}$ máximo (mL h ⁻¹)	$Q_{biogás}$ média (mL h ⁻¹)
Polietileno	368	134 ± 56	362	115 ± 42
Espuma	402	132 ± 68	272	131 ± 52
Cerâmica	259	66 ± 36	179	38 ± 31

Figura 14 – Produção temporal de biogás em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descarte de biomassa; (a) polietileno; (b) espuma; (c) cerâmica

Comparando as duas operações, as produções máximas de biogás foram 48% e 44% maiores com os leitos de espuma e cerâmica, respectivamente com a retirada frequente de biomassa. Este aumento não foi observado no reator com leito de polietileno. Durante a fase de estabilidade, sem descartes de biomassa, a produção média de biogás com polietileno diminuiu 14%. Já no reator com leito de espuma não houve alteração e com cerâmica a produção cessou completamente.

Segundo a Tabela 8, a porcentagem de composição do biogás foi similar para todos os casos com aproximadamente 70% de hidrogênio e 30% de dióxido de carbono. Em nenhum caso foi detectada a presença de metano.

Tabela 8 – Porcentagem média da composição do biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)
Polietileno	69 ± 7	31 ± 7	69 ± 4	31 ± 4
Espuma	67 ± 6	33 ± 6	69 ± 4	31 ± 4
Cerâmica	70 ± 5	30 ± 5	74 ± 5	26 ± 5

Os perfis temporais da eficiência de conversão de sacarose (E_s) são apresentados na Figura 15 e as E_s médias durante a fase de estabilidade na Tabela 9. Os reatores com leito de polietileno e espuma tiveram uma E_s média similar em ambas as operações, porém sem descartes de biomassa houve um aumento próximo de 8% nos dois reatores. Com leito de cerâmica este incremento foi de 21%. No entanto, se comparado com os outros leitos, a E_s média da cerâmica foi 26% e 18% menor com e sem descartes de biomassa, respectivamente.

Tabela 9 – Eficiência média de conversão de sacarose em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa	Sem descarte de biomassa
	E_s média (%)	E_s média (%)
Polietileno	64 ± 11	70 ± 11
Espuma	66 ± 09	71 ± 10
Cerâmica	48 ± 11	58 ± 14

Figura 15 – Eficiência de conversão de sacarose (E_s) em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (a) polietileno (b) espuma (c) cerâmica

O leito ordenado e o escoamento descendente facilitaram o acúmulo de biomassa na parte inferior dos reatores, conforme pode ser observado na Figura 16. A cada 20 dias foram descartados 200 mL de líquido do fundo dos reatores com concentração média de SVT de $12 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ no reator com leito de polietileno, $11 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$ com leito de espuma e $13 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$ com leito de cerâmica.

Figura 16 – Acúmulo de biomassa no fundo dos reatores de leito ordenado operado com escoamento descendente

O arraste de biomassa do sistema ocorreu de forma contínua, embora sem nenhuma tendência, como observado na Figura 17. De tal modo, em todos os casos, a média da vazão mássica de SSV no efluente foi calculada tendo em conta todo o período experimental conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Vazão mássica média da biomassa de arraste em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa	Sem descarte de biomassa
	$\dot{w}_x$ média (mg SSV h ⁻¹)	$\dot{w}_x$ média (mg SSV h ⁻¹)
Polietileno	119 ± 87	85 ± 55
Espuma	96 ± 62	119 ± 93
Cerâmica	68 ± 64	88 ± 47

Figura 17 – Vazão mássica da biomassa de arraste ($\dot{w}_x$) em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (a) polietileno (b) espuma (c) cerâmica

Outro parâmetro analisado no meio líquido foi a formação de produtos solúveis da fermentação (PSF) conforme Tabela 11. O ácido acético, o ácido butírico e o etanol foram os principais PSF nos três reatores em ambas as operações, com e sem descartes de biomassa. Ocasionalmente, observou-se a produção de traços do ácido propiônico, sendo este relacionado com o consumo de hidrogênio.

Tabela 11 – Produção média dos PSF em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa durante a fase de estabilidade

Leito	Etanol (mg DQO L ⁻¹)	Ácido acético (mg DQO L ⁻¹)	Ácido butírico (mg DQO L ⁻¹)	Ácido propiônico (mg DQO L ⁻¹)
Com descartes de biomassa				
Polietileno	439 ± 150	378 ± 105	252 ± 119	6 ± 10
Espuma	427 ± 248	319 ± 105	327 ± 183	13 ± 20
Cerâmica	175 ± 186	203 ± 82	151 ± 86	0 ± 0
Sem descartes de biomassa				
Polietileno	266 ± 142	321 ± 87	333 ± 110	8 ± 9
Espuma	142 ± 195	429 ± 134	241 ± 136	25 ± 36
Cerâmica	90 ± 83	268 ± 102	211 ± 189	9 ± 24

O balanço de carbono foi calculado conforme item 4.6.3 e é apresentado na Tabela 12. A diferença entre a DQO afluenta e efluente foi atribuída a PSF não detectados pelo método de cromatografia usado nesta estratégia.

Tabela 12 - Balanço de carbono em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	DQO_{af} (mg L ⁻¹)	$DQO_{t(PSF)}$ (mg L ⁻¹)	DQO_x (mg L ⁻¹)	DQO_{SE} (mg L ⁻¹)	DQO_{H_2} (mg L ⁻¹)	DQO_{ef} (mg L ⁻¹)	$DQO_{ef/af}$
Com descartes							
Polietileno	2.057	1.075	90	730	52	1.800	0,95
Espuma	2.057	1.086	86	704	47	1.780	0,93
Cerâmica	2.031	529	70	1044	14	1.598	0,82
Sem descartes							
Polietileno	1.958	928	69	586	35	1.528	0,83
Espuma	1.958	840	82	570	45	1.488	0,79
Cerâmica	1.782	578	64	735	11	1.359	0,78

5.2.3. Produção de hidrogênio em reatores com leito ordenado

Para avaliar o desempenho dos reatores na produção de hidrogênio utilizou-se a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) representada em litros de hidrogênio por litro de reator por dia ($L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$) e o rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}) em mol de hidrogênio por mol de sacarose convertida ($mol\ H_2\ mol^{-1}_{sc}$).

A Tabela 13 apresenta os valores máximos de PVH e Y_{H_2} , sendo estes observados durante a fase transiente do sistema nos três reatores operados com e sem descartes de biomassa. Se comparadas as duas operações, os melhores PVH e Y_{H_2} foram obtidos nos três reatores quando operados com descartes de biomassa. Dentre os três leitos, a melhor PVH foi atingida no leito de espuma e os melhores Y_{H_2} nos leitos de polietileno e espuma. Entretanto, estes valores foram 29% e 47% menores, respectivamente, quando os reatores foram operados sem descartes de biomassa.

Tabela 13 – Valores máximos de produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (fase transiente)

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	PVH ($L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$)	Y_{H_2} ($mol\ H_2\ mol_{sc}^{-1}$)	PVH ($L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$)	Y_{H_2} ($mol\ H_2\ mol_{sc}^{-1}$)
Polietileno	1,7	3,8	1,5	2,0
Espuma	2,1	3,7	1,5	2,0
Cerâmica	1,4	2,2	1,1	0,8

Durante a fase de estabilidade, a produção média de hidrogênio caiu consideravelmente em relação à etapa transiente tal como apresentado na Tabela 14. No entanto, na maioria dos casos com exceção do leito de cerâmica operado sem descartes de biomassa, a produção de hidrogênio foi contínua até o final da operação.

Tabela 14 – Valores médios de produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa (fase de estabilidade)

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	PVH ($L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$)	Y_{H_2} ($mol\ H_2\ mol_{sc}^{-1}$)	PVH ($L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$)	Y_{H_2} ($mol\ H_2\ mol_{sc}^{-1}$)
Polietileno	$0,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
Espuma	$0,6 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$
Cerâmica	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,2$

Se comparado com os trabalhos anteriores desenvolvidos no LPB-EESC-USP em reatores de leito fixo empacotado e escoamento ascendente (FERNANDES, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010; GODOI, 2010; LIMA e ZAIAT, 2012; PENTEADO, LAZARO, *et al.*, 2013; CARMINATO, 2013), a ordenação do leito e o escoamento descendente foram favoráveis para a produção contínua e estável de hidrogênio. A primeira característica (ordenação do leito) contribuiu para a diminuição do acúmulo de biomassa no leito e a segunda (escoamento descendente) facilitou a saída natural de biomassa no efluente e também a sedimentação no fundo dos reatores. Essa afirmação pode ser suportada pela estimativa geral de biomassa em ambas as operações com e sem descartes (Tabela 15 e Tabela 16, respectivamente).

Por um lado, o acúmulo de biomassa no leito, representada pela biomassa aderida e intersticial, correspondeu em média a aproximadamente 5% do total de biomassa produzida. Em leito empacotado com polietileno de baixa densidade e escoamento ascendente, Anzola-Rojas *et al.* (2014) observaram que essa porcentagem foi igual a 20%, ou seja, a ordenação do leito diminuiu o acúmulo de biomassa no leito em aproximadamente 15%.

Por outro lado, a saída natural de biomassa no leito ordenado em todos os casos foi maior que 80%, enquanto no reator de leito fixo chegou até 70% do total de biomassa produzida (ANZOLA-ROJAS, GONÇALVES, *et al.*, 2014). Adicionalmente, em relação à sedimentação, a biomassa descartada periodicamente pelo fundo dos reatores correspondeu a 46%, 40% e 32% do total da biomassa dentro do reator no leito de polietileno, espuma e cerâmica, respectivamente.

Tabela 15 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado com descartes de biomassa

Biomassa/Substrato	Polietileno	Espuma	Cerâmica
Biomassa gerada após 120 dias de operação			
Dentro do reator (mg)	32.524	33.703	48.972
Aderida e intersticial	8.566	9.533	6.653
Suspensa	8.970	10.908	26.550
Descartada periodicamente (mg)	14.988	13.262	15.768
Arrastada naturalmente (mg)	340.115	283.298	212.613
Total biomassa gerada (mg)	372.640	316.597	261.585
Total sacarose consumida (mg)	5.615.419	5.132.970	3.958.149
Coefficiente $Y_{x/s}$ (g SSV g ⁻¹ sc)	0,066	0,062	0,066
Biomassa arrastada (%)	91	90	81
Biomassa dentro do reator (%)	9	10	19

Tabela 16 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado sem descarte de biomassa

Biomassa/Substrato	Polietileno	Espuma	Cerâmica *
Biomassa gerada após 90 dias de operação			
Dentro do reator (mg)	42.699	15.520	23.471
Aderida e intersticial	8.625	9.148	13.985
Suspensa	34.074	6.372	9.486
Arrastada naturalmente (mg)	187.463	240.342	116.372
Total biomassa gerada (mg)	230.162	255.862	139.843
Total sacarose consumida (mg)	4.485.950	4.244.892	2.208.476
Coefficiente $Y_{x/s}$ (g SSV g ⁻¹ sc)	0,051	0,060	0,063
Biomassa arrastada (%)	81	94	83
Biomassa dentro do reator (%)	19	6	17

* Após 60 dias quando a produção de biogás cessou completamente.

5.2.4. Comparação entre as operações em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa e com diferentes materiais suporte

Em geral, se comparados os três leitos independente da operação observa-se que o polietileno e a espuma tiveram comportamento similar, pois em ambos os reatores foram observados os maiores valores de PVH , Y_{H_2} e E_s (Tabela 13 e Tabela 9, respectivamente).

A cerâmica indicou ser um material suporte não adequado para produção de hidrogênio, uma vez que apresentou a maior anomalia no padrão de escoamento com atraso de aproximadamente 1 h no TDH médio. A E_s média foi próxima de 50% com elevado desvio padrão e a produção de biogás foi a mais baixa entre os três reatores, sendo que em uma das operações a produção cessou completamente. No balanço de carbono, apresentado na Tabela 12, também é possível observar que a cerâmica teve a menor porcentagem da DQO envolvida na produção de hidrogênio.

Por outro lado, comparando as duas operações, com e sem descartes de biomassa, nos três reatores foi feito o Teste de Tukey utilizando o programa Microsoft Excel[®]. Este teste permite verificar se existem diferenças entre dois grupos de dados mediante a porcentagem de diferença, sendo estatisticamente diferentes quando essa porcentagem é menor que 5% (0,05). Entre as duas operações e reatores, a E_s , PHV , Y_{H_2} e produção de ácido propiônico foram comparadas durante a fase de estabilidade. Os resultados do teste são apresentados da Tabela 17 a Tabela 20.

Tabela 17 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. E_s em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Leito/operação	Polietileno CD*	Polietileno SD**	Espuma CD*	Espuma SD**	Cerâmica CD*	Cerâmica SD**
Média	64,52	69,67	66,32	70,51	48,15	58,24
Variância	123,10	115,12	65,77	103,06	96,12	206,48
Observações	46,00	28,00	45,00	28,00	53,00	21,00
Diferença hipotética das médias	0,00		0,00		0,00	
Graus de liberdade	59,00		48,00		28,00	
Estadístico t	-1,98		-1,85		-2,96	
P(T<=t) uma calda	0,03		0,04		0,00	
Valor crítico de t (uma calda)	1,67		1,68		1,70	
P(T<=t) duas caldas	0,053	Igual	0,070	Igual	0,006	Diferente
Valor crítico de t (duas caldas)	2,00		2,01		2,05	

*CD: com descarte. **SD: sem descarte

Tabela 18 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. PVH em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Leito/operação	Polietileno CD*	Polietileno SD**	Espuma CD*	Espuma SD**	Cerâmica CD*	Cerâmica SD**
Média	0,59	0,45	0,61	0,63	0,32	0,19
Variância	0,04	0,03	0,10	0,07	0,04	0,03
Observações	43,00	28,00	46,00	26,00	44,00	20,00
Diferença hipotética das médias	0,00		0,00		0,00	
Graus de liberdade	66,00		60,00		48,00	
Estadístico t	3,02		-0,32		2,59	
P(T<=t) uma calda	0,00		0,37		0,01	
Valor crítico de t (uma calda)	1,67		1,67		1,68	
P(T<=t) duas caldas	0,004	Diferente	0,75	Igual	0,01	Diferente
Valor crítico de t (duas caldas)	2,00		2,00		2,01	

*CD: com descarte. **SD: sem descarte

Tabela 19 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. Y_{H_2} em reator anaeróbio de leito ordenado escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Leito/operação	Polietileno CD*	Polietileno SD**	Espuma CD*	Espuma SD**	Cerâmica CD*	Cerâmica SD**
Média	0,59	0,42	0,53	0,55	0,42	0,26
Variância	0,06	0,02	0,06	0,05	0,07	0,05
Observações	42,00	28,00	44,00	26,00	41,00	20,00
Diferença hipotética das médias	0,00		0,00		0,00	
Graus de liberdade	68,00		56,00		45,00	
Estadístico t	3,61		-0,21		2,43	
P(T<=t) uma calda	0,00		0,42		0,01	
Valor crítico de t (uma calda)	1,67		1,67		1,68	
P(T<=t) duas caldas	0,0006	Diferente	0,8316	Igual	0,0191	Diferente
Valor crítico de t (duas caldas)	2,00		2,00		2,01	

*CD: com descarte. **SD: sem descarte

Tabela 20 – Teste t para duas amostras supondo variâncias desiguais. Produção de ácido propiônico em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Leito/operação	Polietileno CD*	Polietileno SD**	Espuma CD*	Espuma SD**	Cerâmica CD*	Cerâmica SD**
Média	5,59	7,88	13,62	27,61	0,00	9,20
Variância	97,38	77,08	409,14	1327,36	0,00	593,05
Observações	18,00	8,00	22,00	12,00	23,00	7,00
Diferença hipotética das médias	0,00		0,00		0,00	
Graus de liberdade	15,00		15,00		6,00	
Estadístico t	-0,59		-1,23		-1,00	
P(T<=t) uma calda	0,28		0,12		0,18	
Valor crítico de t (uma calda)	1,75		1,75		1,94	
P(T<=t) duas caldas	0,56	Igual	0,24	Diferente	0,36	Diferente
Valor crítico de t (duas caldas)	2,13		2,13		2,45	

*CD: com descarte. **SD: sem descarte

Observou-se que no leito de polietileno, ainda que a E_s média tenha sido estatisticamente igual em ambas as operações, sem descartes de biomassa, a PVH média e o Y_{H_2} médio foram 23% e 29% menores, respectivamente, enquanto a produção de ácido propiônico não teve alteração. No leito de espuma, a E_s média, PVH média e Y_{H_2} entre as duas operações foram estatisticamente iguais, no entanto, a produção de ácido propiônico sem descartes de biomassa foi duas vezes o valor atingido com descartes de biomassa. No leito de cerâmica, a E_s média sem descartes de biomassa foi 21% maior, porém a PVH média e o Y_{H_2} médio foram 41% e 38% menores, respectivamente, enquanto houve aparecimento de ácido propiônico.

Desta forma, as observações nos testes estatísticos permitiram inferir que os descartes de biomassa favoreceram a produção de hidrogênio, provavelmente devido à renovação da população microbiana, uma vez que na ausência dos descartes observou-se formação de PSF não relativos ou adversos para este fim tais como o ácido propiônico. Segundo Dinamarca e Bakke (2009) este comportamento poderia estar relacionado com a idade e envelhecimento do lodo, uma vez que os descartes permitiram a saída de biomassa mais antiga onde provavelmente foram estabelecidos os microorganismos consumidores ou não produtores de hidrogênio.

Assim, poderia se explicar o fato dos picos máximos de PVH e Y_{H_2} observados no tempo transiente serem coincidentes com o primeiro descarte nos três reatores. Provavelmente, a porcentagem de biomassa retirada no primeiro descarte em comparação com a biomassa acumulada dentro do reator pode ter sido maior que a porcentagem de biomassa retirada durante a fase de estabilidade, sugerindo que descartes maiores ou mais frequentes poderiam melhorar a produção de hidrogênio nesta última fase.

Contudo, apesar das variações entre os leitos e as operações, em todos os sistemas a tendência do desempenho ao longo do tempo foi similar a resultados observados em reatores do mesmo tipo, embora com escoamento ascendente, leito empacotado e alteração de alguns parâmetros, tais como relação C/N (ANZOLA-ROJAS, 2010), material suporte e TDH (FERNANDES, 2008), inóculo e pré-tratamentos (PENTEADO, LAZARO, *et al.*, 2013), grau de mistura (LIMA e ZAIAT, 2012) e variação da concentração de cálcio (CARMINATO, 2013).

Em todos os trabalhos, inclusive neste, a maior vazão de biogás ocorre durante a fase transiente seguido de uma queda contínua, que em muitos casos cessa completamente. No entanto, a composição do biogás manteve a distribuição similar independente do volume

produzido. Foram observados, principalmente, hidrogênio e dióxido de carbono com percentagens próximas de 60% e 40%, respectivamente.

A divisão do tempo experimental em fase transiente e de estabilidade foi definida pela eficiência de conversão de sacarose, uma vez que durante a fase transiente este parâmetro aumenta continuamente até alcançar um patamar que no qual passa a ser constante. A fase de estabilização que começa justamente no ponto de início do patamar vai até o final da operação, sendo neste período que geralmente ocorre a diminuição na produção de biogás.

Essa queda contínua tem sido associada a mudanças na estrutura microbiana ocasionada pelo acúmulo de biomassa no reator ao longo do tempo. As mudanças poderiam incluir o desenvolvimento de microorganismos consumidores de hidrogênio ou não produtores, ou a ativação de rotas metabólicas adversas tais como a produção de ácido acético pela homoacetogênese. Estudos recentes também apontaram que estes problemas poderiam surgir pelo aumento da competição pelo substrato, uma vez que a quantidade de substrato alimentado é inalterada causando o decréscimo constante da carga orgânica volumétrica específica (COVe) (ANZOLA-ROJAS, GONÇALVES, *et al.*, 2014; CARMINATO, 2013).

5.2.5. O comportamento da COVe em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Para avaliar o comportamento da COVe ao longo do tempo, inicialmente foi estimado o coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$) conforme o item 4.2. Considerando os seis reatores, o $Y_{x/s}$ foi em média 0,063 g SSV g⁻¹_{sc} (Tabela 15 e Tabela 16). Este valor foi próximo do observado por Kim, Han e Shin (2006) de ≈0,09 g SSV g⁻¹ SC em reator CSTR operado a 35°C e utilizando sacarose como substrato e ao crescimento descrito por Drake, Göbner e Daniel (2008) ao observar que 6% do carbono afluente foi utilizado para síntese de biomassa por bactérias acetogênicas.

A Figura 18 apresenta a COVe em cada reator e operação. Observa-se que a queda deste parâmetro ocorreu de forma potencial não mostrando um tempo de estabilização, sendo que todas as curvas se ajustaram a uma função do tipo Harris ($y = (a + bx^c)^{-1}$) com ajuda do OriginPro 8.0[®] com coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,95 na operação com descartes de biomassa e de 0,99 na operação sem descartes de biomassa. Vale ressaltar que este ajuste representou a tendência matemática do parâmetro não tendo sentido físico.

Dado que os valores máximos de produção de hidrogênio foram observados no período relativo à fase transiente, a Tabela 21 mostra a faixa da COVe e o valor médio para

este mesmo período. Observa-se que em todos os reatores a COVe foi similar com uma média próxima de $10 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. Este valor que em todos os casos ocorreu no meio da fase transiente coincidiu com os picos máximos de produção de hidrogênio.

Figura 18 – COVe ao longo do tempo em reator de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Tabela 21 – Faixa da COVe e COVe média na fase transiente em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	COVe Faixa (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Faixa (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)
Polietileno	13,6 – 7,2	10,4 ± 4,6	17,4 – 3,7	10,5 ± 9,7
Espuma	14,2 – 6,2	10,2 ± 5,7	14,3 – 6,3	10,3 ± 5,6
Cerâmica	12,8 – 6,7	9,7 ± 4,4	13,7 – 6,4	10,0 ± 5,2

Da mesma forma, a faixa da COVe e a média durante a fase de estabilidade é apresentada na Tabela 22. É possível notar que, durante este período a COVe média na maioria dos reatores foi entre 4,5 e 5,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, com exceção do reator com leito de polietileno operado sem descartes de biomassa. Esta faixa que indica uma queda aproximada de 66% da COVe inicial (próxima de 14 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹) também coincide com a diminuição na produção de hidrogênio. No caso do reator com leito de polietileno, durante este período a porcentagem da queda da COVe foi próxima de 81%.

Tabela 22 – Faixa da COVe e COVe média na fase de estabilidade em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa		Sem descarte de biomassa	
	COVe Faixa (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Faixa (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	COVe Média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)
Polietileno	7,1 – 3,4	5,2 ± 2,6	3,6 – 1,7	2,6 ± 1,3
Espuma	6,1 – 2,8	4,5 ± 2,3	6,2 – 3,4	4,8 ± 2,0
Cerâmica	6,5 – 1,7	4,8 ± 2,4	6,2 – 2,9	4,5 ± 2,3

Em um trabalho anterior, Anzola-Rojas et al. (2014) sugeriram que um sistema em que o valor da COVe é próximo de 6 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ poderia manter a produção de hidrogênio contínua em um reator de leito fixo e escoamento ascendente. Similarmente, Hafez et al. (2010) indicaram uma faixa adequada entre 4,4 e 6,4 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹ em reatores de mistura completa. Nesta estratégia, durante a fase de estabilidade, em quatro das seis operações, a ordenação do leito e o escoamento descendente permitiram manter a COVe perto do valor sugerido e foi observada continuidade na PVH e no Y_{H_2} ainda que com elevado desvio padrão.

Observaram-se dois casos pontuais com comportamento diferente. No reator com leito de cerâmica operado sem descartes de biomassa, a produção de hidrogênio cessou por volta

do quinquagésimo dia de operação, ainda com COVe média de $4,5 \pm 2,3$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} . Contrariamente, no reator com leito de polietileno operado sem descartes de biomassa a produção de hidrogênio foi contínua durante a fase de estabilidade, embora o valor médio da COVe fosse de $2,6 \pm 1,3$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , que corresponde quase a um valor 50% menor em comparação com os outros reatores deste trabalho.

Ambos os casos poderiam ser um indicio de marcantes variações na estrutura microbiana devido à forma de retenção da biomassa dentro do reator, ou seja, à distribuição porcentual entre a biomassa aderida e intersticial e a biomassa suspensa. No caso do leito de cerâmica operado sem descartes, 60% da biomassa retida no reator esteve aderida ao leito facilitando o seu envelhecimento, enquanto que com descartes a percentagem de adesão foi de 14%. O envelhecimento poderia ser associado a bactérias consumidoras de hidrogênio, pois se comparadas as duas operações, observa-se que com uma maior adesão de biomassa houve produção de ácido propiônico, enquanto que com descartes de biomassa a geração deste ácido foi nula e a produção de hidrogênio contínua.

Ao contrário, no reator com leito de polietileno operado sem descartes, 80% da biomassa retida esteve suspensa, o que sugere a facilidade de renovação da biomassa. Esta renovação poderia ser associada a bactérias produtoras de PFS favoráveis para a produção de hidrogênio como o ácido butírico, pois se comparadas as duas operações, observa-se que com descartes, a diminuição da geração deste ácido (24% menor) foi concomitante com a diminuição da somatória da percentagem de biomassa em suspensão mais os descartes (6% menor).

Desta forma, vale ressaltar que, ainda que o valor da COVe tenha influência sobre a produção de hidrogênio e o desempenho dos reatores em sistemas de culturas mistas, o valor adequado deste parâmetro pode depender da distribuição da estrutura microbiana. Isso ficou mais evidente nestes últimos dois casos, pois os reatores foram mais afetados pela forma de acumulação de biomassa que pela própria diminuição da COVe.

5.2.6. Homoacetogênese e hidrogênio não liberado em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente, com e sem descartes de biomassa

Segundo a estequiometria da reação, a geração do ácido acético e do butírico poderia ser indicador de elevados rendimentos de hidrogênio, uma vez que o valor teórico do rendimento de hidrogênio a partir de sacarose formando só ácido acético é de $8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose e formando só ácido butírico é de $4 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose (MAINTINGUER,

FERNANDES, *et al.*, 2008). No entanto, o ácido acético pode ser produzido pela rota de produção de hidrogênio conforme Reação 15, pela via homoacetogênica conforme Reação 16 ou por ambas.

Sendo assim, a vazão molar do ácido acético pode ser calculada pela Equação 34.

$$[HAc] = [HAc]_{H_2} + [HAc]_{Hc} \quad \textbf{Equação 34}$$

Na qual $[HAc]$ corresponde à vazão molar de ácido acético total em $mmol\ h^{-1}$; $[HAc]_{H_2}$ à vazão molar de ácido acético liberando hidrogênio em $mmol\ h^{-1}$ e $[HAc]_{Hc}$ à vazão molar de ácido acético via homoacetogênese em $mmol\ h^{-1}$.

Desta forma, a vazão molar de hidrogênio $[H_2]$ pode ser determinada pela Equação 35 (LUO, KARAKASHEV, *et al.*, 2011).

$$[H_2] = 4[HAc]_{H_2} + 4[HBu] - [HPr] - 4[HAc]_{Hc} \quad \textbf{Equação 35}$$

Na qual, $[HBu]$ à vazão molar de ácido butírico em $mmol\ h^{-1}$ e $[HPr]$ à vazão molar de ácido propiônico em $mmol\ h^{-1}$.

Substituindo a Equação 34 na Equação 35, e isolando o $[HAc]_{Hc}$ tem-se a vazão molar de ácido acético formado via homoacetogênese como apresentado na Equação 36.

$$[HAc]_{Hc} = \frac{4[HAc]_{H_2} + 4[HBu] - [HPr] - [H_2]}{8} \quad \textbf{Equação 36}$$

Dessa forma, com os valores médios experimentais dos PSF e do hidrogênio calculou-se a percentagem de ácido acético produzido via homoacetogênese nos três reatores, em ambas as operações durante todo o período experimental (Tabela 23). Observou-se que para todos os casos essa porcentagem foi próxima de 60% desde o início da operação, sugerindo que o método de inoculação e modo de operação do reator (estruturação do leito e escoamento descendente) não foram adequados para inibir as bactérias homoacetogênicas.

Adicionalmente, o acúmulo de biomassa poderia não estar relacionado com este tipo de bactérias e sim com outros microorganismos consumidores ou não produtores de hidrogênio, pois, enquanto a COVe diminuiu ao longo do tempo, a percentagem de homoacetogênese pareceu inalterada.

Tabela 23 – Percentagem de ácido acético gerado via homoacetogênese em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descartes de biomassa	Sem descartes de biomassa
	[HAc] _{Hc} (%)	[HAc] _{Hc} (%)
Polietileno	58 ± 9	65 ± 15
Espuma	63 ± 10	61 ± 11
Cerâmica	63 ± 12	61 ± 9

Descontada a percentagem de ácido acético gerado pela homoacetogênese, o hidrogênio teórico a partir dos PSF foi calculado pela Equação 35. A porcentagem de hidrogênio liberado em relação ao teórico durante a fase de estabilidade em ambas as operações é apresentado na Tabela 24.

Tabela 24 – Porcentagem da vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) liberada em relação à teórica durante a fase de estabilidade em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente operado com e sem descartes de biomassa

Leito	Com descarte de biomassa			Sem descarte de biomassa		
	v_{H_2} teórica	v_{H_2} liberada	%	v_{H_2} teórica	v_{H_2} liberada	%
	(mmol h ⁻¹)	(mmol h ⁻¹)		(mmol h ⁻¹)	(mmol h ⁻¹)	
Polietileno	28,8 ± 7,0	3,8 ± 1,3	14	26,7 ± 6,0	2,4 ± 1,2	10
Espuma	25,7 ± 5,5	3,5 ± 1,4	15	29,1 ± 8,1	3,4 ± 1,7	12
Cerâmica	13,7 ± 4,6	1,4 ± 0,9	10	18,3 ± 3,3	1,1 ± 1,1	6

Observa-se que a porção de hidrogênio liberado não supera 15% do hidrogênio teórico em nenhum dos casos. Uma parte do hidrogênio inicialmente produzido pode ter sido utilizada para síntese celular, enquanto outra pode ter ficado presa no meio líquido. No entanto, não é possível definir quais as percentagens em cada caso. Para Paus et al. (1990) as perdas de hidrogênio dissolvido no efluente líquido chegaram a 62% em um reator de manta de lodo e filtro operado com escoamento ascendente. Os autores observaram que em uma ampla faixa de condições de mistura e de carga orgânica aplicada, o hidrogênio foi entre 35 e 71 vezes mais concentrado do que o valor de equilíbrio esperado.

Em sistemas anaeróbios onde espécies gasosas são formadas na fase líquida e tendem a escapar para a fase gasosa, as limitações de transferência implicam concentrações de gás dissolvido maiores que os valores correspondentes ao equilíbrio. Tais superconcentrações podem ser adversas para o sistema biológico, gerando efeitos termodinâmicos negativos (PAUSS, ANDRE, *et al.*, 1990). Para Zhang et al. (2012) a supersaturação de hidrogênio no meio líquido é inevitável em um sistema fermentativo de cultura mista e ocorre justamente porque a velocidade de produção de hidrogênio é maior que a velocidade de transferência de massa líquido-gás.

Em reatores com retenção física de biomassa, como os utilizados nesta estratégia, o decréscimo na eficiência de transferência de massa depois de um tempo de operação tem sido associado à aglomeração de biomassa e à falta de mistura eficiente. Não havendo força de cisalhamento suficiente para ajudar a separar o biogás aderido às partículas do lodo, as bolhas fazem com que as partículas flutuem e cubram a superfície no topo do reator, resultando em um processo fermentativo ineficiente e instável e mesmo na desativação do reator (REN, TANG, *et al.*, 2010).

Evidências fotográficas apresentadas na Figura 19 podem ser um indício do comportamento descrito por Ren et al. (2010) nesta estratégia.

Figura 19 – Evidências fotográficas de biomassa flutuando no topo do reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente, operado com TDH de 2 h e concentração de substrato de 2 g DQO L⁻¹.

Sendo assim, as perdas de hidrogênio aqui observadas podem ter sido causadas pelas limitações de transferência de massa que levaram à supersaturação de hidrogênio no meio líquido. Adicionalmente, esse hidrogênio dissolvido junto com o dióxido de carbono podem

ter promovido a homoacetogênese ou outras reações metabólicas secundárias não favoráveis para o sistema (ZHANG, ZHANG, *et al.*, 2012; KRAEMER e BAGLEY, 2008).

5.2.7. Conclusões parciais - Estratégia 2

Os resultados da estratégia 2 permitiram observar que manter a COVe em uma faixa adequada pode levar à produção de hidrogênio de forma contínua, validando, em parte, a sub-hipótese 2, com relação à operação do reator de leito ordenado e escoamento descendente com ou sem descarte programado de biomassa.

A ordenação do leito permitiu resolver os problemas físicos observados no leito empacotado utilizado na estratégia 1, uma vez que houve aumento na porosidade do leito de aproximadamente 28%, diminuindo as anomalias no padrão de escoamento, pois os TDH reais do leito ordenado com leito de polietileno e espuma (1,71 e 2,12 h, respectivamente) foram mais próximos do TDH teórico (2 h). Com isso, a recuperação do biogás foi viável no reator anaeróbio com leito ordenado e escoamento descendente. A vazão máxima de biogás foi de 368, 402 e 250 mL h⁻¹ com leitos de polietileno, espuma e cerâmica, respectivamente.

Comparado com o leito empacotado com escoamento ascendente utilizado por Anzola-Rojas *et al.* (2014), a ordenação do leito diminuiu o acúmulo de biomassa em aproximadamente 15% e o escoamento descendente aumentou a saída natural de biomassa em aproximadamente 10% e permitiu que 5% do total de biomassa fosse sedimentada para posteriores descartes. Estas características permitiram manter o valor da carga orgânica volumétrica específica (COVe) média entre 2,6 e 5,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ durante o tempo de estabilidade, observando continuidade na produção de hidrogênio até o final da operação com PVH média de 0,6 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e Y_{H₂} médio de 0,5 mol H₂ mol_{sc}⁻¹ nos reatores com leito de polietileno e espuma.

Dentre os três materiais usados para a adesão da biomassa (polietileno, espuma e cerâmica), a cerâmica se mostrou como não adequado para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente, uma vez que apresentou a menor eficiência de conversão de sacarose (48%), PVH média (0,2 L H₂ L⁻¹ d⁻¹) e Y_{H₂} médio (0,1 mol H₂ mol_{sc}⁻¹). Adicionalmente, a produção de biogás cessou completamente quando este reator foi operado sem descartes de biomassa.

Os descartes de biomassa sedimentada foram favoráveis para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente, uma vez que tais

descartes poderiam ter sido em sua maioria microorganismos consumidores ou não produtores de hidrogênio.

Manter um valor adequado da COVe constante em um reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente pode ser a chave para manter a continuidade na produção de hidrogênio. No entanto, em culturas mistas, como no caso desta estratégia, o valor sugere uma dependência da distribuição da biomassa dentro do reator.

A principal perda de hidrogênio no reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente ocorre no efluente líquido, uma vez que provavelmente devido à baixa velocidade de transferência de massa líquido-gás houve supersaturação de hidrogênio dissolvido. Adicionalmente, esse fenômeno que ocorreu desde o começo da operação contínua pode ter propiciado o consumo de hidrogênio e dióxido de carbono pela homoacetogênese.

5.3. Estratégia 3 - Reator anaeróbio com leito empacotado operado com escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa.

Os resultados da estratégia 2 permitiram observar que a manutenção da COVe em uma faixa adequada, por meio da ordenação do leito, o escoamento descendente e os descartes de biomassa, pode levar a produção de hidrogênio de forma contínua ao longo do tempo. A comparação entre ambas as operações, com e sem descarte de biomassa, indicou que aumentar o volume ou a frequência dos descartes durante a fase de estabilidade poderia melhorar essa produção devido à renovação de biomassa favorável para tal fim dentro do reator. Por outro lado, reatores de leito empacotado e escoamento ascendente têm mostrado melhor eficiência de conversão de sacarose (FERNANDES, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010), o que também poderia terminar no aumento da produção de hidrogênio.

Deste modo, essas observações sugeriram que a operação de um reator de leito empacotado com controle da COVe por meio de descartes de biomassa, porém com escoamento ascendente, uma vez que os resultados da estratégia 1 indicaram inviabilidade do escoamento descendente neste tipo de leito, poderia melhorar o desempenho geral do reator de leito fixo e conseqüentemente garantir uma produção contínua e estável de hidrogênio.

Assim, durante 103 dias, operou-se continuamente um reator anaeróbio de leito empacotado, usando polietileno de baixa densidade como material suporte, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa. O TDH aplicado foi de 2 h e a temperatura se manteve controlada em 25°C. Os descartes de biomassa foram programados tentando manter a COVe próxima de 6 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, sendo esse valor o sugerido por Anzola-Rojas et al. (2014) para manter contínua a produção de hidrogênio neste tipo de reator.

5.3.1. Descartes de biomassa

Para programar os descartes de biomassa foram consideradas a eficiência de conversão de sacarose (E_s) constante de 80% e a porcentagem de biomassa saindo no efluente de 70% conforme resultados observados por Anzola-Rojas et al. (2014). O coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$) foi considerado 0,06 g SSV g⁻¹_{sc} conforme observado na estratégia 2, sendo este valor mais próximo ao descrito na literatura (KIM, HAN e SHIN, 2006; DRAKE, GÖBNER e DANIEL, 2008).

No décimo dia de operação contínua, coletaram-se 200 mL do fundo do reator a fim de conhecer a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) acumulados e desta forma,

estimar o próximo descarte buscando manter a COVe constante conforme apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Carga orgânica volumétrica específica (COVe) estimada a partir da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do primeiro descarte de biomassa em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente

No entanto, o acúmulo de sólidos no fundo do reator foi variável e com tendência a diminuir, uma vez que a biomassa ficou retida no leito tal como mostrado na Figura 21. Esse comportamento levou a que o volume dos descartes fosse cada vez maior tentando-se retirar biomassa do próprio leito.

Figura 21 – Crescimento e retenção de biomassa no leito empacotado ao longo do tempo

Assim, por volta do sexagésimo dia os descartes foram de aproximadamente 2 L com concentração de SSV próxima de 2 g L⁻¹ conforme mostrado na Figura 22. Vale ressaltar, que devido à impossibilidade de filtragem das amostras causada pela elevada concentração de biomassa, a concentração de SSV foi estimada como a concentração dos sólidos voláteis totais (SVT).

Figura 22 – Descartes frequentes de biomassa em reator anaeróbico de leito empacotado. Concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e volume total descartado (V).

A COVe ao longo do tempo foi calculada conforme a metodologia descrita no item 4.6. Inicialmente, a estimativa de biomassa total produzida e a sacarose total consumida foi feita após 103 dias de operação contínua conforme Tabela 25.

Tabela 25 – Estimativa da biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbico de leito empacotado e escoamento ascendente

Biomassa/Substrato	Nesta estratégia* (com descartes de biomassa)	Anzola-Rojas et al. (2014)** (sem descartes de biomassa)
Dentro do reator (mg)	67.417	19.293
Aderida e intersticial	15.504	12.941
Suspensa	5.760	6.352
Descartada periodicamente (mg)	46.152	0
Arrastada naturalmente (mg)	149.612	44.297
Total biomassa gerada (mg)	217.029	63.590
Total sacarose consumida (mg)	5.000.691	2.294.417
Coefficiente $Y_{x/s}$ (g SSV g ⁻¹ sc)	0,043	0,028
Biomassa arrastada (%)	69%	70%
Biomassa dentro do reator (%)	31%	30%

*Após 103 dias de operação contínua. **Após 60 dias de operação contínua

Se comparado com os valores inicialmente considerados para estimar a COVe, na Tabela 25 é possível notar que a porcentagem de biomassa arrastada foi coincidente, enquanto o $Y_{x/s}$ foi 20% menor. Desta forma, a COVe real ao longo do tempo foi calculada e

comparada com a COVe estimada e a COVe observada por Anzola-Rojas et al. (2014) na Figura 23.

Figura 23 – Comparativo da COVe real e estimada em reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente com descartes de biomassa e COVe observada por Anzola-Rojas et al. (2014) em reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente sem descartes de biomassa

É possível notar que, apesar de serem insuficientes para alcançar o valor planejado de $6 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, nesta estratégia os descartes de biomassa permitiram manter a COVe estável em média em $2,6 \pm 0,4 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$ desde aproximadamente o trigésimo dia de operação.

5.3.2. Desempenho de reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa

Os perfis temporais do desempenho geral do reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa (PVH , o Y_{H_2} e E_s) junto com o perfil da COVe são apresentados na Figura 24. No intuito de ter um padrão de comparação com os trabalhos desenvolvidos anteriormente no LPB-EESC-USP, na mesma figura também são mostrados os resultados descritos por Anzola-Rojas et al. (2014) em um reator anaeróbico de leito fixo, escoamento ascendente sem descartes de biomassa e relação C/N de 140. Similarmente aos trabalhos de Anzola-Rojas (2010), Godoi (2010), Lima e Zaiat (2012), Penteado et al. (2013) e Carminato (2013), o tempo experimental foi dividido em fase transiente e fase de estabilidade, definidas pela conversão da sacarose. Nesta estratégia, observou-se que a fase de estabilidade começou por volta do trigésimo dia de operação.

Figura 24 – Desempenho de reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes periódicos de biomassa (●-●). Desempenho de reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente sem descartes periódicos de biomassa (●-●) (Anzola-Rojas et al, 2014). Produção volumétrica de hidrogênio (PVH); rendimento de hidrogênio (Y_{H2}); eficiência de conversão de sacarose (E_s).

Diferente desses trabalhos, durante a fase de estabilidade a produção de hidrogênio foi contínua até o final da operação com PVH média de $2,2 \pm 0,2 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e Y_{H_2} médio de $1,6 \pm 0,4 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$. Adicionalmente, a PVH e o Y_{H_2} foram 11% e 9% mais estáveis, respectivamente, se comparado com os desvios padrão observados por Anzola-Rojas et al. (2014) no mesmo período conforme apresentado na Tabela 26. Os descartes de biomassa permitiram manter a COVe entre 1,7 e 3,7 g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , ou seja, com uma variação de 16% durante aproximadamente 70 dias que durou a fase de estabilidade.

Tabela 26 – Desempenho de reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade

Parâmetro operacional/reator		Nesta estratégia (com descartes de biomassa)	Anzola-Rojas et al. (2014) (sem descartes de biomassa)
PVH ($\text{L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Mínimo	1,3	1,0
	Máximo	3,2	3,9
	Média	$2,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,8$
	Desvio padrão (%)	20	31
Y_{H_2} ($\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$)	Mínimo	0,8	1,0
	Máximo	2,4	3,2
	Média	$1,6 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,7$
	Desvio padrão (%)	24	33
E_s (%)	Mínimo	72	81
	Máximo	100	100
	Média	89 ± 7	89 ± 5
	Desvio padrão (%)	8	6
COVe (g sacarose g^{-1} SSV d^{-1})	Mínimo	1,7	2,1
	Máximo	3,7	4,8
	Média	$2,6 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,9$
	Desvio padrão (%)	16	27

Por outro lado, se comparada a produção média de hidrogênio desta estratégia com a estratégia 2, durante a fase de estabilidade nos reatores com leito de polietileno e espuma, observa-se um aumento de quase 4 vezes na PVH médio ($\approx 0,6 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e quase 3 vezes no Y_{H_2} médio ($\approx 0,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}_{sc}$), ainda com a COVe próxima da observada no reator de leito de polietileno operado sem descartes de biomassa ($2,6 \pm 1,3 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$).

A manutenção da COVe em um valor estável durante a fase de estabilidade, embora menor que o sugerido por Anzola-Rojas et al. (2014) ($\approx 6 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$), favoreceram a continuidade na produção de hidrogênio sem alterar a eficiência de conversão de sacarose. Entretanto, observou-se variação da estrutura microbiana segundo a formação e distribuição dos produtos solúveis da fermentação (PSF).

A concentração média dos PSF no meio líquido encontra-se na Tabela 27 e o balanço da DQO na Tabela 28. Similar às observações de Anzola-Rojas et al. (2014), os principais PSF foram o ácido acético, o ácido butírico e o etanol. A produção de ácido propiônico não superou os 60 mg L^{-1} , sendo este valor equivalente a 3% da DQO afluyente.

Tabela 27 – Concentração média dos produtos solúveis da fermentação em reator anaeróbio de leite empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade

Leito	Nesta estratégia (com descartes de biomassa) (mg DQO L ⁻¹)	Anzola-Rojas et al. (2014) (sem descartes de biomassa) (mg DQO L ⁻¹)
Ácido acético	455 ± 106	435 ± 55
Ácido butírico	212 ± 39	338 ± 124
Ácido propiônico	61 ± 20	64 ± 19
Etanol	344 ± 101	712 ± 56

Tabela 28 – Balanço da DQO em reator anaeróbio de leite empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade

Leito	DQO_{af} (mg L ⁻¹)	$DQO_{t(PSF)}$ (mg L ⁻¹)	DQO_x (mg L ⁻¹)	DQO_{SE} (mg L ⁻¹)	DQO_{H_2} (mg L ⁻¹)	DQO_{ef} (mg L ⁻¹)	$DQO_{ef/af}$
Nesta estratégia	1.887	1.084	71	234	56	1.330	0,77
Anzola Rojas et al. (2014)	1.835	1.549	46	182	70	1.847	1,01

Nesta estratégia, a concentração de etanol foi aproximadamente 52% menor comparado com o observado por Anzola-Rojas et al. (2014), enquanto a diferença entre a DQO afluyente e efluente aumentou 23%. Essa diferença, como na estratégia 2, pode ser atribuída a produtos não detectados pelo método cromatográfico usado.

Provavelmente, os descartes de biomassa promoveram a utilização da sacarose para formação de outros PSF como o ácido láctico. Na glicólise, o ácido láctico emerge diretamente do piruvato, enquanto o etanol emerge do Acetil-CoA, ou seja, de um passo adicional no processo. Contudo, a geração de um ou ambos, etanol e/ou ácido láctico, é indesejável no

processo fermentativo quando o objetivo é a produção de hidrogênio, uma vez que não estão relacionados com este fim (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010).

5.3.3. Homoacetogênese e hidrogênio não liberado em reator anaeróbio de leito empacotado operado com escoamento ascendente e descartes de biomassa

Conforme Tabela 29, a atividade homoacetogênica não mostrou alteração com os descartes de biomassa, pois a porcentagem de ácido acético gerado por esta rota foi similar ao observado por Anzola-Rojas et al. (2014). Se comparada essa atividade com a dos reatores de leito ordenado de polietileno e espuma da estratégia 2, observa-se em média uma atividade 21% e 26% menor.

Tabela 29 – Ácido acético gerado via homoacetogênese em reator anaeróbio de leito empacotado e escoamento ascendente durante a fase de estabilidade

Parâmetro	Nesta estratégia (com descartes de biomassa)	Anzola-Rojas et al. (2014) (sem descartes de biomassa)
[HAc] _{Hc} (%)	46 ± 4	48 ± 8

Por outro lado, se comparados os reatores com leito de polietileno na Tabela 30, observa-se que a vazão molar de hidrogênio teórica foi similar em todos os casos independente da estruturação do leito, direção do escoamento, descartes de biomassa e COVe. Porém, nos reatores de leito empacotado e escoamento ascendente, a porcentagem de vazão liberada foi 22% maior com descartes de biomassa e 30% maior sem descartes de biomassa.

Tabela 30 - Porcentagem da vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) liberada em relação à teórica em reator anaeróbio de leito fixo, usando polietileno como material suporte

Trabalho	Descartes de biomassa	Leito e direção do escoamento	COVe média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	v_{H_2} teórica (mmol h ⁻¹)	v_{H_2} liberada (mmol h ⁻¹)	%
Nesta estratégia	Com descartes	Empacotado Ascendente	2,6 ± 0,4	27,5 ± 4,9	9,6 ± 9,6	36
Estratégia 2	Com descartes	Ordenado Descendente	5,2 ± 2,6	28,8 ± 7,0	3,8 ± 1,3	14
Estratégia 2	Sem descartes	Ordenado Descendente	2,6 ± 1,3	26,7 ± 6,0	2,4 ± 1,2	10
Anzola-Rojas et al. (2014)	Sem descartes	Empacotado Ascendente	3,3 ± 0,9	26,8 ± 3,2	10,7 ± 3,4	40

Sendo assim, as anteriores observações permitem inferir que o leito empacotado e o escoamento ascendente provavelmente melhoraram a velocidade de transferência de massa líquido-gás, favorecendo a liberação de hidrogênio e ao mesmo tempo diminuindo a atividade homoacetogênica provocada pelo hidrogênio dissolvido.

Por outro lado, o fato de atingir o mesmo valor de vazão teórica de hidrogênio sob diferentes valores da COVe reforça a suposição da dependência deste parâmetro com a distribuição percentual de biomassa dentro do reator. Tanto no reator de leito ordenado de polietileno operado com escoamento descendente e sem descartes de biomassa, como no reator de leito empacotado operado com escoamento ascendente e com descartes de biomassa, a distribuição percentual de biomassa ($\approx 20\%$ aderida e $\approx 80\%$ suspensa) junto com a COVe média e a vazão média teórica de hidrogênio foram similares ($\approx 2,6$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} e ≈ 27 mmol h^{-1} , respectivamente).

Já no resto dos reatores (i.e., de leito ordenado de polietileno e leito ordenado de espuma operados com descartes de biomassa e de leito ordenado de espuma operado sem descartes de biomassa) onde a distribuição percentual de biomassa foi de quase 50% aderida e 50% suspensa, a COVe média foi próxima de 5 g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} para atingir a mesma vazão teórica de hidrogênio (≈ 27 mmol h^{-1}).

5.3.4. Conclusões parciais - Estratégia 3

Os resultados nessa etapa validam, em parte, a sub-hipótese 1, com respeito ao controle da COVe por meio da operação de leito empacotado e escoamento ascendente com descartes periódicos de biomassa.

Os descartes frequentes de biomassa em reator com leito empacotado e escoamento ascendente, usando polietileno de baixa densidade como material suporte permitiram manter a COVe estável em $2,6 \pm 0,4$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , favorecendo a continuidade e estabilidade na produção de hidrogênio com PHV média de $2,2 \pm 0,2$ L H_2 L^{-1} d^{-1} e Y_{H_2} médio de $1,6 \pm 0,4$ mol H_2 $\text{mol}^{-1}_{\text{sc}}$, sem alterar a eficiência média de conversão de sacarose próxima de 89%.

Comparado com o leito ordenado e o escoamento descendente, o leito empacotado junto com o escoamento ascendente favoreceram a velocidade de transferência de massa líquido-gás, aumentando a liberação de hidrogênio em aproximadamente 25% e diminuindo a atividade homoacetogênica em 15%. No entanto, a supersaturação de hidrogênio dissolvido continua sendo motivo de perdas no reator de leito fixo.

A similitude da vazão teórica de hidrogênio baseada na geração dos produtos solúveis da fermentação (PSF) sob diferente valor da COVe reforça a suposição de que este parâmetro depende da distribuição percentual da biomassa dentro do reator.

5.4. Estratégia 4 - Reator anaeróbico com leito ordenado operado com escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa

Os resultados observados na estratégia 3 foram bem sucedidos, uma vez que os descartes de biomassa permitiram manter a COVe em um valor constante, favorecendo a liberação contínua de hidrogênio sem alterar a estabilidade do meio líquido. No entanto, esses descartes não foram suficientes para manter a COVe no valor ótimo sugerido por Anzola-Rojas et al. (2014) de $6 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. Sendo assim, no intuito de aumentar a COVe em um reator anaeróbico de leito fixo e escoamento ascendente, optou-se pela ordenação do leito, pois os resultados da estratégia 2 confirmaram que esta permite a diminuição do acúmulo de biomassa. Sendo assim, neste reator se realizaram descartes de biomassa similares aos efetuados na estratégia 3.

5.4.1. Descartes de biomassa

Para programar os descartes de biomassa neste caso, considerou-se a eficiência de conversão de sacarose (E_s) constante de 70%, o coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$) de $0,06 \text{ g SSV g}^{-1}_{sc}$ e a porcentagem de biomassa saindo no efluente de 86% conforme observado na estratégia 2, no reator de leito ordenado de polietileno operado sem descartes de biomassa. Um primeiro descarte de 200 mL foi realizado no vigésimo sexto dia de operação quando a estimativa da COVe teórica foi de $5 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. A partir da concentração de SSV deste descarte os demais foram programados segundo a Figura 25.

Figura 25 – Carga orgânica volumétrica específica (COVe) estimada a partir da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do primeiro descarte de biomassa em reator anaeróbico de leito ordenado e escoamento ascendente

Realizado o segundo descarte, observou-se um comportamento similar à estratégia 3, pois houve uma marcada diminuição do acúmulo de sólidos no fundo do reator, que foi associada com a ascensão do escoamento. Desta forma, o volume e a frequência dos descartes foram alterados conforme Figura 26.

Figura 26 - Descartes frequentes de biomassa em reator anaeróbico de leito ordenado. Concentração de sólidos voláteis totais (SVT) e volume total descartado (V).

O reator operou continuamente por 100 dias, com TDH de 2 h e temperatura controlada de 25°C. Logo após este período, realizou-se a estimativa de biomassa total gerada e a sacarose total consumida conforme Tabela 31.

Tabela 31 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa

Biomassa/Substrato	Quantidade
Dentro do reator (mg)	74.042
Aderida e intersticial	10.207
Suspensa	7.502
Descartada periodicamente (mg)	56.334
Arrastada naturalmente (mg)	192.282
Total biomassa gerada (mg)	266.324
Total sacarose consumida (mg)	4.505.748
Coefficiente $Y_{x/s}$ (g SSV g ⁻¹ sc)	0,059
Biomassa arrastada (%)	72%
Biomassa dentro do reator (%)	28%

Observa-se que o fator $Y_{x/s}$ foi próximo de $0,06 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ sc}$, coincidente com o valor considerado inicialmente, enquanto a porcentagem de biomassa saindo do reator foi 14% menor. Entretanto, os descartes frequentes foram 8% maiores em relação à biomassa dentro do reator, comparado com a estratégia 3 (Tabela 25). Desta forma, a COVe real ao longo do tempo foi calculada conforme apresentado na Figura 27 e comparada com a COVe estimada e a COVe real da estratégia 3.

Figura 27 - Comparativo da COVe estimada com a COVe real em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa e COVe real em reator anaeróbico de leito empacotado, escoamento ascendente e descartes de biomassa observada na estratégia 3

Nesta ocasião, após o dia 40 de operação os descartes foram excessivos, levando a COVe média até $6,9 \pm 2,3 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, sendo este valor 15% maior que o planejado e com desvio padrão igual a 33%.

5.4.2. Desempenho em reator de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes frequentes de biomassa

Na Figura 28 são apresentados os perfis temporais da PVH , o Y_{H_2} e a E_s junto com a COVe no reator anaeróbico de leito ordenado com descartes programados de biomassa. A produção máxima de hidrogênio ocorreu durante a fase transiente. No entanto, neste caso observou-se um pico máximo, contínuo e estável durante dez dias consecutivos com PVH média de $3,13 \pm 0,07 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, ou seja, com desvio padrão igual a 2%.

Figura 28 – Desempenho de reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes periódicos de biomassa (▲). Produção volumétrica de hidrogênio (PVH); rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}); eficiência de conversão de sacarose (E_s).

A continuidade e estabilidade nesse valor de PVH , não observada antes em reatores similares (FERNANDES, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010; GODOI, 2010; LIMA e ZAIAT, 2012; PENTEADO, LAZARO, *et al.*, 2013; CARMINATO, 2013) e inclusive em nenhum dos reatores usados neste trabalho, foi atingida com $COVe$ média de $4,4 \pm 0,8$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , isto é, um incremento de 69% neste parâmetro comparado com a estratégia 3.

Durante o mesmo período, o Y_{H_2} médio atingiu $2,3 \pm 0,2$ mol H_2 mol $^{-1}_{sc}$ e a E_s foi de $68 \pm 5\%$, ambos com desvio padrão equivalente a 7% conforme Tabela 32. Se comparados estes valores com a estratégia 3 durante a fase de estabilidade (Tabela 26), a PVH e o Y_{H_2} foram 42% e 44% maiores e 13% e 9% mais estáveis, respectivamente.

Tabela 32 – Desempenho de reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa

Parâmetro operacional/reator		Pico máximo *	Fase de estabilidade **
PVH (L H_2 L $^{-1}$ d $^{-1}$)	Mínimo	3,02	0,5
	Máximo	3,22	1,6
	Média	$3,13 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,3$
	Desvio padrão (%)	2	30
Y_{H_2} (mol H_2 mol $^{-1}_{sc}$)	Mínimo	1,98	0,4
	Máximo	2,51	1,7
	Média	$2,30 \pm 0,16$	$0,9 \pm 0,4$
	Desvio padrão (%)	7	41
E_s (%)	Mínimo	62	43
	Máximo	77	80
	Média	68 ± 5	61 ± 10
	Desvio padrão (%)	7	17
$COVe$ (g sacarose g^{-1} SSV d $^{-1}$)	Mínimo	3,3	3,6
	Máximo	5,3	11,8
	Média	$4,4 \pm 0,8$	$6,9 \pm 2,3$
	Desvio padrão (%)	19	33

*Entre os dias 12 e 22 de operação. **A partir do quadragésimo dia de operação.

Apesar disso, imediatamente após o pico máximo, observa-se um forte declínio no desempenho geral do reator até aproximadamente o quadragésimo dia de operação, quando se observou uma possível fase de estabilidade do sistema. O critério de estabilidade baseou-se em um desvio padrão menor que 25% em pelo menos um dos três parâmetros, PVH , Y_{H_2} ou

E_s . Neste caso, somente a E_s se mostrou estável com desvio padrão igual a 17% segundo a Tabela 32.

O início dessa queda no desempenho foi coincidente com o início dos descartes de biomassa no vigésimo sexto dia de operação, ainda com COVe estável em $3,4 \pm 0,4$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} entre o dia 26 e 40 de operação. Este comportamento leva a supor que os descartes de biomassa realizados durante este período foram excessivos, causando a desestabilização da comunidade microbiana. A partir do quadragésimo primeiro dia de operação, o sistema tendeu a se estabilizar de novo com uma E_s média de $61 \pm 10\%$, embora com COVe média acima do valor esperado.

A concentração média dos PSF no meio líquido é apresentada na Tabela 33 e o balanço da DQO na Tabela 34. No pico máximo se observou principalmente produção de ácido butírico, enquanto que durante a fase de estabilidade predominaram o ácido acético e o etanol. Adicionalmente, no balanço da DQO se observa que entre o pico máximo e a fase de estabilidade houve diminuição de 3 vezes a DQO envolvida na produção de hidrogênio, coincidente com o aumento de quase 3 vezes na concentração do ácido propiônico.

Tabela 33 – Concentração média dos produtos solúveis da fermentação em reator anaeróbio de leite ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa

PSF	Pico máximo* (mg DQO L ⁻¹)	Fase de estabilidade** (mg DQO L ⁻¹)
Ácido acético	214 ± 36	289 ± 103
Ácido butírico	293 ± 43	166 ± 40
Ácido propiônico	18 ± 4	50 ± 25
Etanol	256 ± 74	364 ± 159

Tabela 34 – Balanço da DQO em reator anaeróbio de leite ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa

Leito	DQO_{af} (mg L ⁻¹)	$DQO_{t(PSF)}$ (mg L ⁻¹)	DQO_x (mg L ⁻¹)	DQO_{SE} (mg L ⁻¹)	DQO_{H_2} (mg L ⁻¹)	DQO_{ef} (mg L ⁻¹)	$DQO_{ef/af}$
Pico máximo*	1.829	781	73	585	60	1.413	0,82
Fase de estabilidade**	1.829	868	68	690	20	1.524	0,90

*Entre os dias 12 e 22 de operação. **A partir do quadragésimo dia de operação.

Apesar da diminuição na concentração dos PSF, comparado com a estratégia 3 e com o trabalho de Anzola-Rojas et al. (2104), a percentagem da atividade homoacetogênica não foi alterada com a ordenação do leite (Tabela 35), sendo este valor próximo de 50% em todos os

casos. Sendo assim, a homoacetogênese pode estar mais relacionada com o efeito de transferência de massa que com a COVe como sugerido na estratégia 3.

Tabela 35 – Ácido acético gerado via homoacetogênese e percentagem da vazão molar de hidrogênio liberado em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento ascendente e descartes de biomassa

Parâmetro	Pico máximo*	Fase de estabilidade**
[HAc] _{Hc} (%)	49 ± 4	54 ± 4
v_{H_2} teórica (mmol h ⁻¹)	25,2 ± 2,4	22,7 ± 5,4
v_{H_2} liberada (mmol h ⁻¹)	13,5 ± 0,4	4,5 ± 1,3
v_{H_2} liberada (%)	54	21

*Entre os dias 12 e 22 de operação. **A partir do quadragésimo dia de operação.

Por outro lado, na Tabela 35 também é possível observar que a percentagem de hidrogênio liberado durante o pico máximo foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a observada durante a fase de estabilidade. Este aumento foi coincidente com uma produção de ácido butírico aproximadamente 2 vezes maior durante o mesmo período (Tabela 33), indicando que esta rota metabólica é a mais favorável para a produção de hidrogênio neste tipo de sistema.

5.4.3. Conclusões parciais - Estratégia 4

Os resultados observados nessa estratégia de operação validam, em parte, a sub-hipótese 1, com relação ao controle da COVe mediante descartes programados de biomassa em reator de escoamento ascendente e, em parte, a sub-hipótese 2, em relação à diminuição do acúmulo intersticial de biomassa por meio da ordenação do leito.

A ordenação do leito no reator anaeróbico com escoamento ascendente permitiu no período de pico um aumento da COVe média de 69% comparado com a estratégia 3. A COVe média atingiu $4,4 \pm 0,8$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, levando a PVH média a $3,13 \pm 0,07$ L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e o Y_{H_2} médio a $2,3 \pm 0,2$ mol H₂ mol⁻¹_{sc}, ou seja, um aumento de 42% e 44%, respectivamente. No entanto, os descartes de biomassa realizados após este período de continuidade e estabilidade foram excessivos, causando instabilidade no sistema.

5.5. Estratégia 5: Variação da carga orgânica volumétrica (COV) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente.

Nesta estratégia, o objetivo principal foi evitar a diminuição da COVe mediante a variação da COV. Para isto, operou-se um reator anaeróbio com leito ordenado de polietileno, escoamento descendente e sem descartes de biomassa durante 185 dias. O tempo experimental se dividiu em 6 fases operacionais consecutivas de aproximadamente 30 dias cada uma, sem reinoculação do sistema.

Cada fase consistiu em operar o reator sob uma COV diferente. Durante as duas primeiras fases o TDH aplicado foi de 2 h e concentração de substrato de 1 e 2 g DQO L⁻¹, perfazendo uma COV de 12 e 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Logo após, durante as fases seguintes o TDH aplicado foi de 4 h e concentrações de substrato de 2, 4, 8 e 16 g DQO L⁻¹, perfazendo uma COV de 12, 24, 48 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

5.5.1. Desempenho geral de reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Os perfis temporais da E_s , $Q_{biogás}$ e composição do biogás são exibidos na Figura 29 e na Tabela 36 são apresentados os valores médios por fase de cada um dos parâmetros.

Tabela 36 – Desempenho médio de reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Fase	COV (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	E_s (%)	$Q_{biogás}$ (mL h ⁻¹)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	pH efluente
1	12	62 ± 10	31 ± 51	45 ± 16	22 ± 5	5,1 ± 0,6
2	24	49 ± 5	136 ± 55	51 ± 4	35 ± 4	4,6 ± 0,1
3	12	74 ± 7	5 ± 11	48 ± 7	35 ± 7	4,4 ± 0,1
4	24	83 ± 14	768 ± 167	44 ± 1	56 ± 2	4,3 ± 0,1
5	48	83 ± 9	1743 ± 339	40 ± 1	59 ± 3	4,0 ± 0,1
6	96	71 ± 11	3472 ± 570	37 ± 1	60 ± 1	4,2 ± 0,2

Durante as fases 1 e 2, a vazão de biogás aumentou de 31 a 136 mL h⁻¹ quando a carga orgânica passou de 12 para 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ com TDH de 2 h. O biogás foi composto por hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio. Metano não foi detectado.

Figura 29 – Perfil temporal da eficiência média de conversão de sacarose (E_s) vazão ($Q_{biogás}$) e composição de biogás em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Durante a fase 1, a diminuição da vazão de biogás alterou a sua composição, sendo observado um aumento constante na porcentagem de nitrogênio devido à uma maior diluição, gerada pelo ar contaminante na amostragem. Na fase 2, a vazão de biogás e a composição foram constantes, no entanto o aumento da COV afetou negativamente a E_s com uma diminuição de 21%.

Na fase 3, o aumento do TDH para 4 h com consequente diminuição da COV para 12 g DQO L⁻¹ d⁻¹ aumentou 25% a E_s média, porém durante os primeiros 10 dias da mudança, observaram-se pequenas oscilações de biogás de menos de 50 mL h⁻¹ seguidas de uma produção completamente nula. Nas fases 4 e 5, com o aumento da concentração do substrato até uma COV de 24 e 48 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, a vazão de biogás atingiu um pouco mais de 1,7 L h⁻¹ e a E_s média aumentou 9%.

Finalmente, na fase 6, o aumento da COV até 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹ levou a vazão média de biogás próxima de 3,5 L h⁻¹, porém a E_s média teve uma queda de 14%. O biogás foi composto principalmente por dióxido de carbono e hidrogênio e a porcentagem de nitrogênio caiu para aproximadamente 1% entre as fases 4 e 6.

Os PSF se dividiram em principais e secundários dependendo da concentração, assim o valor médio de cada um, em cada fase é apresentado na Tabela 37 e na Tabela 38, respectivamente. Durante as fases 1, 2 e 3 os principais produtos foram o ácido acético, o ácido butírico e o etanol. Já durante as fases 4, 5 e 6, com o aumento da concentração do substrato de 4 para 16 g DQO L⁻¹ observaram-se principalmente a produção de ácido acético, ácido láctico e etanol.

Tabela 37 – Produção média dos PSF principais em reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Fase	Ácido acético (mg DQO L ⁻¹)	Ácido Butírico (mg DQO L ⁻¹)	Ácido Láctico (mg DQO L ⁻¹)	Etanol (mg DQOL ⁻¹)
1	110 ± 30	157 ± 45	24 ± 7	144 ± 54
2	153 ± 34	204 ± 29	31 ± 5	259 ± 43
3	296 ± 40	285 ± 46	45 ± 15	370 ± 116
4	688 ± 162	353 ± 47	280 ± 93	1.304 ± 321
5	1.140 ± 130	239 ± 58	805 ± 110	3.250 ± 460
6	1.929 ± 438	400 ± 240	1.038 ± 605	5.474 ± 1.368

Nos produtos secundários, a principal mudança ocorreu durante as fases 4, 5 e 6 com o aparecimento do butanol e propanol, enquanto a produção de ácido isobutírico diminuiu. O ácido propiônico não apresentou variação entre as fases, indicando que sua produção não

esteve relacionada com a mudança do TDH ou com a concentração inicial de substrato. Por outro lado, os traços do ácido valérico e isovalérico foram observados somente quando a COV foi de 12 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e finalmente a maior concentração de ácido caprótico foi observada na fase 3 quando se estimou a menor COV do sistema de $2,8 \pm 0,3$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹.

Tabela 38 – Produção média dos PSF secundários em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Fase	Bu-OH ¹ (mg DQO L ⁻¹)	Pro-OH ² (mg DQO L ⁻¹)	H-Pr ³ (mg DQO L ⁻¹)	H-Isobu ⁴ (mg DQO L ⁻¹)	H-Isova ⁵ (mg DQO L ⁻¹)	H-Va ⁶ (mg DQO L ⁻¹)	H-Ca ⁷ (mg DQO L ⁻¹)
1	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 3	23 ± 15	1 ± 1	2 ± 2	41 ± 14
2	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 5	45 ± 16	0 ± 0	0 ± 0	53 ± 11
3	0 ± 0	0 ± 0	34 ± 7	93 ± 15	0 ± 0	3 ± 3	160 ± 35
4	8 ± 6	3 ± 5	37 ± 9	29 ± 47	0 ± 0	0 ± 0	110 ± 35
5	6 ± 2	11 ± 2	46 ± 21	2 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	52 ± 37
6	4 ± 6	12 ± 2	41 ± 41	5 ± 7	0 ± 1	0 ± 0	33 ± 43

¹Bu-OH: Butanol. ²Pro-OH: Propanol. ³H-Pr: Ácido propiônico. ⁴H-Isobu: Ácido isobutírico. ⁵H-Isova: Ácido isovalérico. ⁶H-Va: Ácido valérico. ⁷H-Ca: Caprótico.

No balanço de carbono apresentado na Tabela 39, observou-se uma diferença entre a DQO efluente e afluyente de menos de 10% em todas as fases. Excetuando a fase 2, em todas os casos pelo menos 50% da DQO afluyente foi convertida em PSF. Por outro lado, a percentagem da DQO envolvida na produção de hidrogênio nas fases com COV igual ou maior que 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ (2, 4, 5 e 6) correspondeu a 2%, enquanto que nas fases 1 e 3 quando a COV foi de 12 g DQO L⁻¹ d⁻¹ essa percentagem foi de 0,9% e 0,03%, respectivamente.

Tabela 39 - Balanço de carbono em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Fase	DQO_{af} (mg L ⁻¹)	$DQO_{t(PSF)}$ (mg L ⁻¹)	DQO_x (mg L ⁻¹)	DQO_{SE} (mg L ⁻¹)	DQO_{H_2} (mg L ⁻¹)	DQO_{ef} (mg L ⁻¹)	$DQO_{ef/af}$
1	896	510	38	331	7,9	818	0,99
2	2.098	765	71	1.042	41,3	1.805	0,91
3	1.889	1.286	94	487	0,6	1.664	0,99
4	4.139	2.812	226	759	89,8	3.396	0,94
5	8.282	5.551	464	1.364	194,7	6.461	0,91
6	15.223	8.864	718	5.019	332,8	13.209	0,98

5.5.2. O comportamento da COVe mediante variação da COV em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente

Como nas estratégias anteriores, a COVe em cada fase foi estimada conforme a metodologia descrita no item 4.6. Após o período experimental, a estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido foi feita conforme apresentado na Tabela 40. Desta forma, o comportamento temporal da COVe em relação à variação da COV é apresentado na Figura 30 e os valores médios por fase na Tabela 41.

Tabela 40 – Estimativa de biomassa total gerada e substrato total consumido em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Biomassa/Substrato	Quantidade
Dentro do reator (mg)	52.102
Aderida e intersticial	7.994
Suspensa	26.399
Acumulada no fundo do reator	17.709
Arrastada naturalmente (mg)	711.354
Total biomassa gerada (mg)	763.456
Total sacarose consumida (mg)	11.471.571
Coeficiente $Y_{x/s}$ (g SSV g ⁻¹ sc)	0,067
Biomassa arrastada (%)	93%
Biomassa dentro do reator (%)	7%

Figura 30 – Comportamento temporal da COVe (—) em relação à variação da COV (—) em reator anaeróbio, leito ordenado e escoamento descendente

Tabela 41 - COVe média estimada em cada fase operacional em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descende e variação da COV

Fase	COV (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	COVe média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	Desvio padrão (%)
1	12	12,0 ± 3,5	30
2	24	8,8 ± 1,7	19
3	12	2,8 ± 0,3	10
4	24	3,8 ± 0,4	11
5	48	4,8 ± 0,7	16
6	96	6,2 ± 0,7	11

Os maiores desvios padrão se observaram durante a fase 1 e 2 quando a COV foi de 12 e 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e o TDH aplicado foi de 2 h. A COV aplicada levou a COVe média ao dobro do valor sugerido por Anzola-Rojas et al. (2014) (≈ 6 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹) durante a fase 1 e a um valor 46% maior durante a fase 2. Já durante as fases seguintes, o incremento do TDH de 4 h favoreceu a estabilidade deste parâmetro com desvios padrão de menos de 16%. Adicionalmente, o aumento da concentração de substrato de 4 para 16 g DQO L⁻¹ (COV de 24 para 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹) manteve a COVe entre 3,8 e 6,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, sendo estes valores mais próximos aos indicados na literatura (ANZOLA-ROJAS, GONÇALVES, *et al.*, 2014; HAFEZ, NAKHLA, *et al.*, 2010; PAN, ZHANG, *et al.*, 2008).

5.5.3. Influência da COVe sobre a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

O perfil temporal de produção de hidrogênio (*PVH* e Y_{H_2}) junto com a COVe é apresentado na Figura 31 e os valores médios por fase na Tabela 42.

Tabela 42 – Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Fase	COVe média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	<i>PVH</i> (L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	Y_{H_2} (mol H ₂ mol ⁻¹ sc)
1	12,0 ± 3,5	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,4
2	8,8 ± 1,7	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3
3	2,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1
4	3,8 ± 0,4	2,4 ± 0,5	1,9 ± 0,3
5	4,8 ± 0,7	4,9 ± 1,0	1,9 ± 0,2
6	6,2 ± 0,7	8,9 ± 1,3	2,2 ± 0,2

Figura 31 – Perfil temporal da produção de hidrogênio e COVe em reator anaeróbico de leito ordenado e escoamento descendente. Produção volumétrica de hidrogênio (PVH); rendimento de hidrogênio (Y_{H_2})

Observa-se que entre a fase 1 e 2 quando a COVe média diminuiu de 12,0 para 8,8 $g\ sacarose\ g^{-1}\ SSV\ d^{-1}$ houve um aumento da PVH e do Y_{H_2} médio de 5 e 3 vezes, respectivamente. No entanto, no passo para a fase 3 com queda excessiva da COVe média para 2,8 $g\ sacarose\ g^{-1}\ SSV\ d^{-1}$, a produção de hidrogênio cessou completamente. Já entre as fases 4 e 6, a manutenção da COVe média entre 3,8 e 6,2 $g\ sacarose\ g^{-1}\ SSV\ d^{-1}$ foi coincidente com o aumento constante da PVH (de 2,4 a 8,9 $L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$) e a estabilidade do Y_{H_2} ao redor de 2 $mol\ H_2\ mol^{-1}\ sc$ em aproximadamente 90 dias. Vale ressaltar que este Y_{H_2} foi aproximadamente 4 vezes maior se comparado com os resultados da estratégia 2 em faixas similares de COVe (Tabela 14 e Tabela 22).

A tendência da produção média de hidrogênio por fase em relação à COVe média é exibida na Figura 32. Os pontos se ajustaram a uma função do tipo GaussAmp ($y = y_0 + Ae^{-(x - x_c)^2/2w^2}$) com ajuda do OriginPro 8.0[®] com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9734 para a PVH média e 0,6030 para o Y_{H_2} médio. Vale ressaltar que essa função representou a tendência matemática e foi usada somente para calcular os pontos máximos não tendo sentido físico. Por meio da derivação da função de ajuste, chegou-se a um ponto de COVe de 6,0 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ para alcançar uma PVH máxima de 8,8 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e COVe de 5,7 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ para atingir um Y_{H_2} máximo de 2,3 mol H₂ mol⁻¹_{sc}, sendo estes valores de COVe próximos aos sugeridos na literatura (ANZOLA-ROJAS, GONÇALVES, *et al.*, 2014; HAFEZ, NAKHLA, *et al.*, 2010; PAN, ZHANG, *et al.*, 2008).

Figura 32 – Tendência da produção de hidrogênio em relação à COVe em reator anaeróbico de leito ordenado e escoamento descendente e variação da COV (a) PVH (b) Y_{H_2}

Elevadas concentrações da COVe, no caso maior que $6 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, poderiam ter causado alguma inibição por sobrecarga de substrato como aconteceu nas fases 1 e 2 quando se observaram as menores eficiências de conversão de sacarose (Tabela 36).

Por outro lado, a variação da COVe pela alteração da COV coincide com algumas mudanças na estrutura microbiana ou nas rotas metabólicas. Para observar isto, na Figura 33 se apresenta a distribuição percentual dos PSF em relação à COVe.

Figura 33 - Distribuição percentual dos PSF em relação à COVe em reator anaeróbico de leite ordenado, escoamento descendente e variação da COV (a) PSF principais; (b) PSF secundários

É possível notar que a tendência da produção de hidrogênio foi similar à produção de etanol. Quando a COVe foi próxima de $6 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, a porcentagem deste PSF

chegou a 62%, enquanto que para COVe de 2,8 e 12,0 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ a percentagem foi próxima de 28% (Figura 33a). Na literatura a produção de etanol tem sido associada com a preferência dos microorganismos produtores de hidrogênio para produzir solventes a baixos valores de pH. Segundo Ren et al. (2007) a faixa adequada para a fermentação do tipo etanol está entre 4,0 e 5,0, sendo esta faixa observada durante todo o período experimental (Tabela 36). De forma similar pode ter acontecido com a formação do butanol, observado em percentagens abaixo de 0,3% na mesma faixa de COVe.

Algumas espécies de *Clostridium* geralmente produzem etanol após a produção de hidrogênio. No entanto, tem sido reportado que este PSF pode ser gerado concomitantemente com hidrogênio em sistemas contínuos (KIM, HAN e SHIN, 2006; ZHU, PARKER, *et al.*, 2009; REN, XING, *et al.*, 2007). Similarmente, *C. acetobutylicum*, microorganismo produtor de hidrogênio pode produzir butanol sob certas quantidades de ácido butírico e pH abaixo de 5 (MINTON e CLARKE, 1989).

As maiores percentagens de produção de ácido láctico também foram observadas com COVe entre 3,8 e 6,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹. Porém, este produto não relacionado com a produção ou consumo de hidrogênio pode ter sido favorecido pelo incremento da pressão parcial de hidrogênio quando a produção de biogás aumentou (LEVIN, PITT e LOVE, 2004) ou como reportado por Minton e Clarke (1989) foi beneficiado pelo aumento da concentração do substrato afluyente.

Contrariamente, nas COVe com menor produção de hidrogênio, observou-se aumento percentual de ácido propiônico, ácido capróico e oscilações de ácido valérico (Figura 33b), sendo estes produtos associados com o consumo de hidrogênio ou não relacionados à produção deste gás.

Ainda que a percentagem total da formação de ácido acético não parecesse ter sido afetada com a variação da COVe, a porção deste ácido formado pela via homoacetogênica teve uma marcada diminuição quando a COVe esteve entre 3,8 e 6,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ (Figura 34). Diferentemente das estratégias 2, 3 e 4 onde a homoacetogênese parece não ter sido afetada pela variação da COVe mediante o controle da biomassa, neste caso o controle da COVe pela mudança da COV pode ter inibido de certa forma essa atividade, favorecendo a liberação de hidrogênio.

Esta inferência pode ser suportada pela quantidade de hidrogênio liberado em relação ao teórico, uma vez que na Figura 35 se observou um comportamento inverso com o da homoacetogênese, a maior percentagem de hidrogênio liberado foi atingida com COVe entre 3,8 e 6,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹. Os valores médios por fase são apresentados na Tabela 43.

Figura 34 – Porcentagem de ácido acético formado pela via homoacetogênica em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Figura 35 – Distribuição percentual do hidrogênio teórico em relação à COVe em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

Tabela 43 – Percentagem vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) liberada em relação ao teórico em reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e com variação da COV

Fase	COVe média (g sacarose g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	v_{H_2} teórica (mmol h ⁻¹)	v_{H_2} liberada (mmol h ⁻¹)	%
1	12,0 ± 3,5	9,6	0,6	6
2	8,8 ± 1,7	12,1	2,4	19
3	2,8 ± 0,3	10,7	0,1	1
4	3,8 ± 0,4	33,1	13,4	42
5	4,8 ± 0,7	46,8	29,2	62
6	6,2 ± 0,7	79,9	50,4	63

5.5.4. O TDH e a concentração do substrato em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente

Como observado anteriormente, na Figura 31, a manutenção da COVe quase constante mediante a variação da COV foi favorável para a produção de hidrogênio, uma vez que durante as fases 4, 5 e 6, quando a COVe média foi de $4,7 \pm 1,1$ g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} observou-se estabilidade no Y_{H_2} médio com $1,9 \pm 0,3$ mol H_2 $\text{mol}^{-1}_{\text{sc}}$ e incremento contínuo na PVH. No entanto, alguns dos resultados sugerem que o TDH e a concentração do substrato também poderiam ter influenciado separadamente o sistema.

Por um lado, incrementar a concentração do substrato parece ter sido favorável para velocidade de produção de hidrogênio e para sua transferência do meio líquido para o gasoso. Na Figura 36 é possível observar que o aumento da concentração ocorreu de forma linear com o aumento da vazão molar de hidrogênio teórico, melhorando a liberação do gás e inversamente diminuindo a percentagem da atividade homoacetogênica (Figura 37). Segundo Ren et al. (2010) aumentar a concentração do substrato no meio líquido pode melhorar o efeito de transferência de massa em sistemas com biomassa aderida, o que pode ter sucedido neste reator.

Figura 36 – Vazão molar de hidrogênio teórico (v_{H_2}) em relação à concentração de substrato afluente (Cs_0) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente

Figura 37 – Percentagem de vazão molar de hidrogênio liberado e homoacetogênese em relação à vazão molar de hidrogênio teórica

Uma evidência fotográfica também poderia contribuir com essa inferência. Na Figura 38 observa-se o registro do reator com 35 dias de operação, quando a concentração de substrato foi de 2 g DQO L⁻¹, e com 121 dias, quando a concentração foi de 4 g DQO L⁻¹. Notou-se no primeiro caso uma grande capa de biomassa flutuando no topo do reator, enquanto que no segundo é possível enxergar a superfície líquida quase livre de biomassa.

Figura 38 – Fotografia da superfície líquida do reator anaeróbico de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV (a) reator com 35 dias de operação, TDH de 2 h, concentração de substrato de 2 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e COVe de 15 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ (b) reator com 121 dias de operação, TDH de 4 h, concentração de substrato de 4 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e COVe de 4,1 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹

Como na estratégia 2, quando a concentração foi de 2 g DQO L⁻¹, o fato da biomassa flutuar foi associado à baixa eficiência de transferência que impediu que as bolhas de gás se desprendessem das partículas de biomassa, levando-as ao topo do reator. Já com o aumento da concentração nesta estratégia esse fenômeno não foi observado.

Por outro lado, as baixas eficiências de conversão de sacarose (E_s) durante as fases 1 e 2, que inicialmente foram associadas a uma sobrecarga de substrato devido às elevadas COVe (12,0 e 8,8 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, respectivamente), podem ter sido causadas pelo baixo tempo de reação quando o TDH aplicado foi 2 h. Estes resultados que também foram observados durante as estratégias 2 e 4, com E_s máxima de 70% em reatores de leito ordenado indiferente da direção do escoamento, foram superados com o aumento do TDH para 4 h nesta estratégia.

O incremento do TDH parece ter favorecido as velocidades de reação, levando a E_s média até 83% e adicionalmente diminuindo a instabilidade da COVe, medida pelo desvio padrão em até 20%, sendo esta última uma característica necessária para a continuidade da produção de hidrogênio. Essa inferência sobre as velocidades de reação poderia ser suportada pela modelagem matemática realizada a partir dos dados experimentais do perfil espacial do reator obtidos no final de cada fase operacional, como a seguir.

5.5.5. Modelagem matemática do desempenho espacial do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV

No intuito de comparar o desempenho do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV ao longo do comprimento em cada fase experimental, adaptou-se o modelo matemático sugerido por Tavares (2008). A diferença do modelo reportado pelo autor anterior, e que neste trabalho considerou a sacarose como substrato em vez de glicose.

Para tanto, realizou-se um perfil espacial no final de cada fase experimental, sendo as concentrações do substrato e dos PSF apresentadas da Tabela 44 a 48.

Tabela 44 – Concentração de sacarose ao longo do reator anaeróbio de leite ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L ⁻¹)	Fase 2 (mg L ⁻¹)	Fase 3 (mg L ⁻¹)	Fase 4 (mg L ⁻¹)	Fase 5 (mg L ⁻¹)	Fase 6 (mg L ⁻¹)
0,00	899,5	1833,3	1936,0	3875,9	7186,6	13970,4
1,25	767,8	1354,4	1008,3	2435,1	3682,0	13389,9
2,50	667,3	1161,2	388,4	562,2	985,4	4713,3
3,75	608,8	1157,2	401,9	513,9	577,6	4695,1
5,00	480,4	1019,0	393,4	441,1	836,5	4483,2
6,25	492,7	843,2	382,0	443,8	941,2	4626,4
7,50	367,9	860,0	376,7	382,7	804,3	4333,0
8,75	305,1	876,8	442,4	413,6	612,5	4412,7

Tabela 45 – Concentração de etanol ao longo do reator anaeróbio de leite ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L ⁻¹)	Fase 2 (mg L ⁻¹)	Fase 3 (mg L ⁻¹)	Fase 4 (mg L ⁻¹)	Fase 5 (mg L ⁻¹)	Fase 6 (mg L ⁻¹)
0,00	5,08	28,00	30,54	72,46	0,00	0,00
1,25	23,37	85,90	182,64	332,84	794,43	68,78
2,50	25,66	120,44	270,52	765,89	1572,88	2323,21
3,75	41,60	122,35	263,67	771,51	1585,90	2106,72
5,00	39,01	126,19	261,61	777,70	1609,19	2331,17
6,25	60,07	157,05	253,71	789,54	1614,68	2405,51
7,50	67,35	156,62	262,57	800,62	1621,49	2421,36
8,75	70,15	156,20	257,06	804,79	1617,55	2483,29

Tabela 46 – Concentração de ácido butírico ao longo do reator anaeróbio de leite ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L ⁻¹)	Fase 2 (mg L ⁻¹)	Fase 3 (mg L ⁻¹)	Fase 4 (mg L ⁻¹)	Fase 5 (mg L ⁻¹)	Fase 6 (mg L ⁻¹)
0,00	2,9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,25	14,6	38,98	107,87	77,46	125,64	3,807
2,50	26,1	65,93	152,06	133,02	117,8	337,88
3,75	34,4	71,97	144,05	138,7	122,8	327,96
5,00	31,0	74,35	137,81	143,74	131,88	322,64
6,25	41,7	88,66	139,28	150,22	118,32	323,76
7,50	71,3	93,31	137,34	150,02	127,68	324,64
8,75	64,5	97,96	137,12	144,64	113,76	328,04

Tabela 47 - Concentração de ácido láctico ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L⁻¹)	Fase 2 (mg L⁻¹)	Fase 3 (mg L⁻¹)	Fase 4 (mg L⁻¹)	Fase 5 (mg L⁻¹)	Fase 6 (mg L⁻¹)
0,00	0,94	0,00	19,35	20,03	0,42	2,98
1,25	20,14	29,70	84,51	159,19	418,46	236,62
2,50	18,05	28,04	77,53	322,90	789,12	1396,68
3,75	21,51	28,84	77,60	319,25	792,74	1443,40
5,00	21,05	28,83	77,73	386,45	797,29	1392,57
6,25	22,99	25,91	81,40	399,26	780,97	1366,85
7,50	23,59	25,99	78,95	412,07	800,65	1537,27
8,75	24,00	26,06	79,62	412,33	788,31	1517,63

Tabela 48 - Concentração de ácido propiônico ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L⁻¹)	Fase 2 (mg L⁻¹)	Fase 3 (mg L⁻¹)	Fase 4 (mg L⁻¹)	Fase 5 (mg L⁻¹)	Fase 6 (mg L⁻¹)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,25	0,00	0,00	14,28	12,76	0,00	0,00
2,50	0,00	15,54	17,62	20,60	0,00	0,00
3,75	0,00	13,68	15,71	14,42	0,00	0,00
5,00	5,18	15,29	15,00	15,30	43,44	0,00
6,25	5,33	16,35	15,53	15,54	32,36	0,00
7,50	6,66	16,84	16,19	16,26	0,00	0,00
8,75	6,71	17,32	15,19	13,96	31,68	0,00

Tabela 49 - Concentração de ácido acético ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado, escoamento descendente e variação da COV em cada fase operacional

L/D	Fase 1 (mg L⁻¹)	Fase 2 (mg L⁻¹)	Fase 3 (mg L⁻¹)	Fase 4 (mg L⁻¹)	Fase 5 (mg L⁻¹)	Fase 6 (mg L⁻¹)
0,00	17,60	24,94	25,63	17,56	0,00	0,00
1,25	43,63	131,76	206,58	363,50	486,08	0,00
2,50	49,27	148,04	319,21	678,56	1131,52	1520,44
3,75	60,02	164,60	304,29	709,62	1033,48	1614,36
5,00	59,77	169,75	294,02	724,80	987,88	1585,52
6,25	84,19	181,95	304,84	791,84	1068,48	1755,80
7,50	107,37	193,78	310,34	756,46	1121,44	1891,68
8,75	96,65	205,61	295,21	777,78	1098,24	1775,84

Neste modelo, considerou-se:

- Todas as reações elementares.
- O volume útil do reator de 3,35 L.
- A solubilidade do gás de $7.36\text{E-}4 \text{ mol H}_2 \text{ L}^{-1}$
- As concentrações de biomassa nas fases 1, 2, 3, 4, 5 e 6, de 1353,9 mg SV; 3219,1 mg SV; 4436,8 mg SV; 6779,5 mg SV; 11638,4 mg SV e 16411,2 mg SV, respectivamente.

5.5.5.1. Reações bioquímicas

As reações bioquímicas envolvidas no processo fermentativo para produção de hidrogênio a partir de sacarose são descritas da Reação 17 a Reação 25 como a seguir:

Sacarose a ácido butírico

Sacarose a ácido acético

Sacarose a ácido propiônico

Sacarose a ácido láctico

Ácido láctico a ácido propiônico

Ácido butírico a ácido acético

Ácido propiônico a ácido acético

Reação 23

Ácido láctico a ácido acético

Reação 24

Sacarose a etanol

Reação 25

Na qual os índices “*k*” são velocidades constantes.

5.5.5.2. Velocidades de reação

A velocidade de uma reação homogênea (*r*) pode ser definida como a variação do número de mols ou massa de um reagente ou produto por unidade de tempo e por unidade de volume da mistura da reação. Nas reações consideradas, a velocidade de formação ou consumo de cada composto foi calculada em função da concentração e seus coeficientes estequiométricos e da constante de velocidade (TAVARES, 2008). As equações do consumo e formação dos produtos neste trabalho são exibidas da Equação 37 à Equação 43:

Sacarose

$$(r_s) = -(k_1 + k_2 + k_4 + k_9)C_x C_s - k_3 C_x C_s C_{\text{H}_2}^4$$

Equação 37

Ácido butírico

$$(r_b) = C_x(k_1 C_s - k_6 C_b)$$

Equação 38

Ácido acético

$$(r_a) = C_x(k_2 C_s + k_6 C_b + k_7 C_p + k_8 C_l)$$

Equação 39

Ácido propiônico

$$(r_p) = C_x(k_3 C_s C_{\text{H}_2}^4 + k_5 C_l C_{\text{H}_2} - k_7 C_p)$$

Equação 40

Ácido láctico

$$(r_l) = C_x (k_4 C_s - C_l (k_5 C_{H_2} + k_8)) \quad \text{Equação 41}$$

Etanol

$$(r_e) = k_9 C_x C_s \quad \text{Equação 42}$$

Hidrogênio

$$r_{H_2} = C_x [C_s (k_1 + k_2) - C_{H_2} (k_3 C_s C_{H_2}^3 + k_5 C_l) + k_6 C_b + k_7 C_p + k_8 C_l] \quad \text{Equação 43}$$

A concentração de H_2O foi desconsiderada, uma vez que é muito mais elevada que qualquer outro produto e ainda depois do consumo de todas as moléculas do reagente, a concentração no final será muito próxima da concentração inicial (TAVARES, 2008). Os subscritos “s”, “b”, “a”, “p”, “l”, “e”, “ H_2 ” e “x” são referentes à sacarose, ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, etanol, hidrogênio e biomassa, respectivamente.

5.5.5.3. Balanço de massa

O desenvolvimento do modelo partiu do balanço de massa, considerando o reator análogo a um reator ideal pistonado como um elemento de volume (∂V). A expressão do balanço de massa foi desenvolvida sobre um volume de controle fechado e possui termos de entrada, saída, geração ou consumo e acumulação de materiais dentro do volume em que as reações se processam como a seguir (TAVARES, 2008):

$$QC_{i_0} - (QC_{i_0} + QC_i) \pm (r_i) \partial V = V \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad \text{Equação 44}$$

Assumindo que $\frac{\partial C_i}{\partial t} = 0$, tem-se:

$$\pm(r_i) = Q \frac{\partial C_i}{\partial V} \quad \text{Equação 45}$$

Pela substituição da Equação 37 a Equação 42 na Equação 45 e solucionando a equação resultante, calculou-se uma expressão para a i -ésima concentração:

$$C_s = C_{s_0} e^{(-C_x \theta h (k_3 C_{H_2}^4 + k_1 + k_2 + k_4 + k_9))} \quad \text{Equação 46}$$

$$C_b = \frac{C_s k_1 - e^{(-C_x \theta h k_6)} (C_s k_1 - C_{b_0} k_6)}{k_6} \quad \text{Equação 47}$$

$$C_a = C_{a_0} + \theta h (C_s C_x k_2 + C_b C_x k_6 + C_p C_x k_7 + C_l C_x k_8) \quad \text{Equação 48}$$

$$C_p = \frac{C_{H_2} C_l k_5 - e^{(-C_x \theta h k_7)} (C_s k_3 C_{H_2}^4 + C_l k_5 C_{H_2} - C_{p_0} k_7) + C_{H_2}^4 C_s k_3}{k_7} \quad \text{Equação 49}$$

$$C_l = \frac{C_s k_4 + e^{(-C_x \theta h (k_8 + C_{H_2} k_5))} (C_{l_0} k_8 - C_s k_4 + C_{H_2} C_{l_0} k_5)}{k_8 + C_{H_2} k_5} \quad \text{Equação 50}$$

$$C_e = C_{e_0} + C_s C_x \theta h k_9 \quad \text{Equação 51}$$

Por conveniência, para a quantificação do hidrogênio no elemento de volume, a vazão molar foi calculada pelo balanço de massa na Equação 52 (TAVARES, 2008):

$$F_{0(H_2)} = F_{(H_2)} + (r_{H_2})_N V - Qs = \frac{\partial N_{H_2}}{\partial t} \quad \text{Equação 52}$$

Considerando o sistema em fase de estabilidade, tem-se:

$$F_{(H_2)} = F_{0(H_2)} + (r_{H_2})_N V - Qs \quad \text{Equação 53}$$

Nas quais $F_{0(H_2)}$ e $F_{(H_2)}$ são a vazão molar de hidrogênio da entrada e na saída, respectivamente, Q é a vazão, e a solubilidade na água ($7.36 \times 10^{-4} \text{ mol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e $(r_{H_2})_N$ é a velocidade de formação de hidrogênio. A $(r_{H_2})_N$ é igual à relação entre (r_{H_2}) e a massa molar do hidrogênio (MMH_2).

A vazão molar de hidrogênio é representada pelo produto entre a vazão do biogás e a concentração. Por tanto (r_{H_2}) e $(r_{H_2})_N$ não foram dependentes da concentração de hidrogênio.

Pela substituição do $(r_{H_2})_N$ para $\frac{(r_{H_2})}{MMH_2}$, tem-se:

$$F_H = F_{H_0} - Q_s + V \frac{C_x}{MMH_2} (\Delta) \quad \text{Equação 54}$$

$$\Delta = C_b k_6 + C_l k_8 + C_p k_7 - C_s k_3 C_{H_2}^4 + C_l k_5 C_{H_2} + C_s (k_1 + k_2)$$

Uma vez que C_{H_2} não é conhecido, uma relação estequiométrica entre a sacarose e o hidrogênio foi estabelecida, como sendo $C_{H_2} = \frac{C_s}{42.75}$. Aliás, uma relação estequiométrica adicional entre o ácido láctico e o hidrogênio foi estabelecida, como sendo $C_{H_2} = \frac{C_l}{45}$ (TAVARES, 2008). Assim, essas relações foram empregadas nas Equações 34, 37, 38 e 42.

5.5.5.4. Constantes cinéticas

Após a substituição anterior, obteve-se um novo conjunto de equações. Usou-se o algoritmo “*trust-region-reflective*” no MatLab® (função *lsqnonlin*) para ajuste não linear de curvas e obteve-se um conjunto de constantes cinéticas, o qual é apresentado na Tabela 50.

Tabela 50 – Constantes cinéticas

Fase	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
1	1,1E-04	1,4E-04	3,5E-14	1,0E-04	4,4E-03	3,3E-05	4,6E-13	2,3E-05	9,7E-05
2	2,1E-05	5,0E-05	6,0E-12	1,9E-05	1,1E-06	9,6E-06	9,5E-05	5,6E-06	3,6E-05
3	3,0E-05	3,3E-05	2,6E-14	2,4E-05	1,7E-04	8,4E-05	1,0E-03	7,8E-07	5,6E-05
4	1,7E-05	1,9E-05	2,4E-14	1,4E-05	2,2E-05	6,7E-05	1,0E-03	4,2E-08	3,5E-05
5	5,1E-06	5,5E-06	4,5E-14	6,7E-06	3,1E-06	7,9E-05	3,0E-03	4,4E-06	1,9E-05
6	2,5E-06	2,8E-06	2,5E-14	3,4E-06	9,8E-07	4,6E-05	3,8E-03	2,4E-07	9,5E-06

5.5.5.5. Concentrações

Usando o conjunto das constantes cinéticas, o modelo teórico das concentrações foi ajustado aos valores experimentais da Figura 39 a Figura 44. Observa-se que a tendência da vazão molar de hidrogênio foi igual em todas as fases experimentais, sendo a maior produção da cabeça do reator independente do TDH aplicado.

Figura 39 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 1

Figura 40 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 2

Figura 41 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 3

Figura 42 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 4

Figura 43 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 5

Figura 44 – Ajuste do modelo teórico das concentrações aos dados experimentais da Fase 6

5.5.5.6. Velocidades de reação ao longo do reator anaeróbio de leito ordenado

Finalmente as velocidades de reação do reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com TDH aplicado de 2 e 4 h são apresentadas da Figura 45 à 53.

Figura 45 – Velocidade da Reação 17 (Sacarose a ácido butírico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 46 – Velocidade da Reação 18 (Sacarose a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 47 – Velocidade da Reação 19 (Sacarose a ácido propiônico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 48 – Velocidade da Reação 20 (Sacarose a ácido lático) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 49 – Velocidade da Reação 21 (Ácido lático a ácido propiônico) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 50 – Velocidade da Reação 22 (Ácido butírico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 51 – Velocidade da Reação 23 (Ácido propiônico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 52 – Velocidade da Reação 24 (Ácido láctico a ácido acético) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Figura 53 – Velocidade da Reação 25 (Sacarose a etanol) em reator anaeróbio de leito ordenado e escoamento descendente com variação da COV

Observou-se que as velocidades das reações a partir de sacarose formando ácido butírico (Figura 45), ácido acético (Figura 46), ácido láctico (Figura 48) e etanol (Figura 53),

foram todas quase constantes ao longo do reator durante as fases 1 e 2 quando o TDH aplicado foi de 2 h, enquanto nas fases 3 a 6 quando o TDH aplicado foi de 4 h, as velocidades foram diminuindo conforme o escoamento foi descendo, ou seja, essas velocidades de reação foram maiores na cabeça do reator (L/D de 1,3) e adicionalmente acima das observadas com TDH de 2 h na maioria dos casos. Essa diferença não foi observada na formação do ácido propiônico a partir de sacarose (Figura 47), pois, independente do TDH aplicado, as velocidades foram quase constantes ao longo do comprimento do reator e não foi possível determinar um aumento da velocidade relacionado ao aumento do TDH.

Por outro lado, sendo a formação de ácido butírico, ácido acético e ácido propiônico os principais PSF envolvidos na produção e consumo de hidrogênio, com TDH de 2 h as velocidades de reação que foram quase constantes ao longo do reator, poderiam ter feito com que o caminho percorrido pelo hidrogênio em direção ao *headspace* fosse mais longo, facilitando o seu consumo. Já com TDH de 4 h como as velocidades foram maiores na cabeça do reator, esse percurso foi menor favorecendo ainda mais a liberação do gás.

5.5.6. Conclusões parciais - Estratégia 5

As mudanças da COV permitiram o controle da COVe em reator anaeróbico de leito ordenado, com polietileno de baixa densidade como material suporte para adesão da biomassa, escoamento descendente e sem descartes de biomassa, levando esse parâmetro a uma faixa ideal para produção de hidrogênio entre 3,8 e 6,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹. Esses resultados validam a sub-hipótese 3.

A manutenção da COVe em $4,7 \pm 1,1$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ permitiu atingir um rendimento contínuo e estável de hidrogênio de $1,9 \pm 0,3$ mol H₂ mol⁻¹_{sc} durante um período de 60 dias e um aumento da PVH de 2,4 a 8,9 L H₂ L⁻¹ d⁻¹.

Por meio dos ajustes matemáticos, chegou-se a uma COVe ótima de 6,0 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ para alcançar um PVH máxima de 8,8 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e COVe de 5,7 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹ para atingir um Y_{H₂} máximo de 2,3 mol H₂ mol⁻¹_{sc}.

Outros fatores como o TDH e a concentração do substrato também podem afetar o desempenho do reator anaeróbico de leito ordenado e escoamento descendente. Por um lado, o TDH de 2 h mostrou ser adverso para o sistema fermentativo devido a que o tempo de reação é insuficiente para o metabolismo celular. Por outro, o incremento da concentração do substrato sugere melhorias na eficiência de transferência de massa, favorável para a liberação de hidrogênio e diminuição da atividade homoacetogênica.

Com a modelagem foi possível corroborar que o escoamento descendente facilitou a liberação do biogás produzido, principalmente no primeiro segmento do leito, uma vez que o biogás contracorrente minimizou o contato do hidrogênio com os possíveis microorganismos consumidores. Este comportamento foi observado marcadamente quando o reator foi operado com TDH de 4 h ao notar que as velocidades de reação de formação de hidrogênio ocorreram de forma mais rápida na cabeça do reator, enquanto as velocidades de consumo foram mantidas quase constantes ao longo do comprimento.

Desta forma, os resultados observados nessa estratégia validam a sub-hipótese 3, referente ao controle da COVe por meio da variação da COV. Por outro lado, a modelagem matemática realizada a partir dos perfis espaciais em cada fase experimental validam em parte, a sub-hipótese 2, referente à saída do gás em contracorrente com a fase líquida com escoamento descendente em reatores de leito ordenado.

6. CONCLUSÕES

A aplicação das diferentes estratégias operacionais em reator anaeróbio de leito fixo utilizadas neste trabalho, tais como o controle da COVe e das características hidrodinâmicas, mediante a manipulação de variáveis como a direção do escoamento, a variação da COV e a disposição adequada dos materiais suporte para adesão da biomassa levaram à produção de hidrogênio de forma contínua e estável.

A operação de três diferentes reatores anaeróbios de leito empacotado com escoamento descendente permitiu comprovar que o uso deste tipo de escoamento requer a ordenação do leito, uma vez que a baixa porosidade do leito empacotado gerou anomalias no padrão de escoamento que interferiram na saída do biogás contracorrente, impossibilitando a coleta do mesmo.

Em contraposição ao leito empacotado, a ordenação do leito junto com o escoamento descendente permitiram a produção contínua de hidrogênio por meio do controle da COVe. Por um lado, o leito ordenado com maior porosidade diminuiu os interstícios e as anomalias no padrão do escoamento, evitando assim o acúmulo de biomassa, enquanto que o escoamento descendente ajudou com a sedimentação e o arraste natural da biomassa. Adicionalmente, a biomassa sedimentada que foi periodicamente descartada sugeriu ter estimulado a renovação da população microbiana favorável para a produção de hidrogênio. Assim, reatores anaeróbios de leito ordenado e escoamento descendente operados com TDH de 2 h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L⁻¹d⁻¹ podem produzir hidrogênio de forma contínua com *PVH* média de 0,6 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e *Y*_{H₂} médio de 0,5 mol H₂ mol_{sc}⁻¹, mantendo a COVe próxima de 5,2 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹.

Por outro lado, os descartes de biomassa programados em reatores de leito empacotado e escoamento ascendente também permitiram o controle da COVe, pois embora a biomassa não fosse sedimentada, o esvaziamento do reator de tempos em tempos sugeriu de igual forma estimular a renovação da população microbiana favorável para a produção de hidrogênio. Dessa forma, operar um reator de leito empacotado, fluxo ascendente, TDH de 2 h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L⁻¹d⁻¹ e descartes frequentes de biomassa mantendo a COVe média em 2,6 ± 0,4 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, permite produzir hidrogênio continuamente com *PVH* média de 2,2 ± 0,2 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e *Y*_{H₂} médio de 1,6 ± 0,4 mol H₂ mol_{sc}⁻¹.

No entanto, esse método de controle da COVe em reatores de leito ordenado e escoamento ascendente mediante descartes de biomassa deve ser realizado mais cuidadosamente, uma vez que a retirada excessiva de lodo pode causar uma desestabilização geral do sistema. Apesar disso, operar um reator de leito ordenado e fluxo ascendente, TDH de 2 h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹ perfazendo uma COV de 24 g DQO L⁻¹d⁻¹ e mantendo a COVe média em $4,4 \pm 0,8$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, pode produzir hidrogênio continuamente com *PVH* média de $3,13 \pm 0,07$ L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e *Y*_{H₂} médio de $2,3 \pm 0,2$ mol H₂ mol⁻¹_{sc}.

A variação da COV em um reator de leito ordenado e escoamento descendente também indicou ser um método efetivo para o controle da COVe, produzindo hidrogênio continuamente com *Y*_{H₂} médio de $1,9 \pm 0,3$ mol H₂ mol⁻¹_{sc} quando esse parâmetro foi mantido em $4,7 \pm 1,1$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹.Adicionalmente, por um lado, com a mudança da COV pelo incremento do TDH, as velocidades de reação favoráveis para a produção de hidrogênio melhoraram no topo do reator, diminuindo o percurso do biogás produzido no meio líquido em direção à fase gasosa. Por outro, o incremento da concentração do substrato parece ter melhorado a eficiência de transferência de massa líquido-gás, aumentando a liberação do hidrogênio produzido e diminuindo a atividade homoacetogênica.

A modelagem matemática dos perfis espaciais do reator anaeróbico de leito empacotado e escoamento descendente permitiu observar que, a saída do gás contracorrente da fase líquida facilitou a liberação do biogás, uma vez que o biogás foi produzido principalmente no primeiro segmento do leito, o que minimizou o contato do hidrogênio com os possíveis microorganismos consumidores.

6.1. Trabalhos futuros

- Operação de reatores anaeróbios de leito fixo de forma sequencial, tendo como ponto final de operação o início da diminuição da produção de biogás, isto é, mantendo os reatores em fase transiente.
- Estudo do fenômeno de transferência de massa líquido-gás que abranja a influência da concentração do substrato, a quantidade de biogás produzido e o tamanho das bolhas de gás.
- Monitoramento da supersaturação de biogás no meio líquido em reator anaeróbico de leito fixo sob diferentes condições operacionais.

- Modelagem matemática e validação do comportamento espacial e temporal do reator anaeróbio de leito fixo, produtor de hidrogênio incluindo a variação de parâmetros como TDH, concentração do substrato, grau de mistura, relação C/N, concentração de cálcio, origem do inóculo, entre outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-GAVIRIA, L. M. et al. Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, 32, 2007. 3141-3146.
- AMORIM, E. L. C. D. et al. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2009. 783-790.
- ANTONOPOULOU, G. et al. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36, 2011. 4843 - 4851.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P. **Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil, p. 89. 2010. Dissertação (Mestrado).
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P. et al. **The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed re.** [S.l.]. 2014. Manuscrito em processo de submissão.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington, DC, USA: American Water Works Association / Water Environment Federation, 2005.
- AROOJ, M. F. et al. Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 6509-6514.
- ASTM INTERNATIONAL. **Standard test method for water absorption, bulk density, apparent porosity and apparent specific gravity of fired whiteware products**. [S.l.]. 2006. (DOI: 10.1520/C0373-88R06).
- BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2009. 3305-3312.
- BICAKOVA, O.; STRAKA, P. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37, 2012. 11563 - 11578.
- CALLI, B. et al. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—Effects of on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 522-530.
- CARMINATO, V. M. **Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 2013. Dissertação (Mestrado).
- CHENG, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Kinetic of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57, n. 1 - 2, 2001. 56 - 64.
- CHEONG, D. Y.; HANSEN, C. L. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. **Bioresource Technology**, 98, 2007. 2229-2239.
- CHERNICHARO, C. L. **Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: DESA/UFMG, v. 5, 1997.

- DAS, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2009. 7349-7357.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, 26, 2001. 13-28.
- DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. 1987. Dissertação (Mestrado).
- DINAMARCA, C.; BAKKE, R. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. **Water Science & Technology—WST**, 59, n. 7, 2009. 1441-1447.
- DRAKE, H. L.; GÖBNER, A. S.; DANIEL, S. L. Old Acetogens, New Light. **New York Academy of Sciences**, 1125, 2008. 100-128. doi: 10.1196/annals.1419.016.
- DRAKE, H. L.; KÜSEL, K.; MATTHIES, C. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, 81, 2002. 203–213.
- DUBOIS, S. M. et al. Colorimetric Methods for determination of sugar and related substance. **Analytical Chemistry**, 28, 1956. 13 – 21.
- FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil, p. 100. 2008. Tese (Doutorado).
- GALES, G. et al. Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. **FEMS Microbiology Letters**, 240, 2004. 155-162.
- GODOI, L. A. G. D. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo ordenado a partir de sacarose tendo espuma de poliuretano como material suporte**. Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil, p. 62. 2010. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental).
- HAFEZ, H. et al. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 2010. 81-92.
- HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, 110, 2012. 1-9.
- HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, 27, n. 5, 2009. 287-297.
- HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. **Journal of Environmental Management**, 95, 2012. S360-S364.
- HILIGSMANN, S. et al. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. **Bioresource Technology**, 102, 2011. 3810–3818.
- HUSSY, I. et al. Continuous Fermentative Hydrogen Production from a Wheat Starch Co-Product by Mixed Microflora. **Biotechnology and Bioengineering**, 84, n. 6, 2003. 619-626.

- JIMENEZ, B. et al. Dextran blue colorant as a reliable tracer in submerged filters. **Water Resources**, 22, n. 10, 1988. 1253-1257.
- JIRKA, A. M.; CARYER, M. J. Micro Semi-Automated Analysis of Surface and Watewaters for Chemical Oxygen Demand. **Analytical Chemistry**, 47, n. 8, 1975. 1397 - 1402.
- KAHYAOĞLU, M.; ŞAHİN, Ö.; SAKA, &. C. Biohydrogen Production from Waste Substrates as a Clean Energy. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, 34, 2012. 1084–1103. DOI: 10.1080/15567031003753546.
- KIM, D.-H. et al. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, 31, 2006. 2158 – 2169.
- KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, 41, 2006. 199–207.
- KÖPKE, M. et al. Clostridium ljungdahlii represents a microbial production platform based on syngas. **PNAS**, 107, n. 29, 2010. 13087 - 13092.
- KOSKINEN, E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. The Relationship Between Instability of H₂ Production and Compositions of Bacterial Communities Within a Dark Fermentation Fluidized-Bed Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 97, 2007. 742-758.
- KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 6558 - 6565.
- KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M. Measurement of H₂ consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. **Water Science & Technology**, 57, n. 5, 2008. 681 - 685.
- LEITE, J. A. et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 579-586.
- LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospect and limitation to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, 29, 2004. 173-175.
- LIMA, D. M. F.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37, n. 12, 2012. 9630-5.
- LUO, G. et al. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production, 108, n. 8, 2011. 1816-1827.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 4309-4317.
- MINTON, P.; CLARKE, D. **Clostridia**. New York: Plenum Press, v. 3, 1989. Serie: Biotechnology handbooks.
- MOCKAITIS, G. **Remoção de 'CD POT.2+' e 'CU POT.2+' de águas residuárias utilizando biorreator anaeróbico contínuo de leito fixo ordenado**. Escola de

- Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos - Brasil, p. 327. 2011. Tese (Doutorado).
- NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. **Waste Biomass Valor**, 1, 2010. 21 - 39.
- OH, S.-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. **Environ. Sci. Technol.**, 37, 2003. 5186-5190.
- OLIVEIRA NETTO, A. P. **Reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo em escala piloto, com recirculação da fase líquida, aplicado ao tratamento de esgoto sanitário**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos - Brasil, p. 195. 2011. Tese (Doutorado).
- PAN, J. et al. Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 6968 - 6975.
- PAUSS, A. et al. Liquid-to-Gas Mass Transfer in Anaerobic Processes: Inevitable Transfer Limitations of Methane and Hydrogen in the Biomethanation Process. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, n. 6, 1990. 1636 - 1644.
- PEIXOTO, G. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxoascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. 2008. Dissertação (Mestrado).
- PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 2011. Tese (Doutorado).
- PENTEADO, E. D. et al. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors, 38, n. 14, 2013. 6137-6145.
- REN, N. et al. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, 22, 2011. 365-370.
- REN, N. Q. et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in biohydrogen production. **Environmental Microbiology**, 9, 2007. 1112-1125.
- REN, N.-Q. et al. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2008. 4318 - 4324.
- REN, N.-Q. et al. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35, 2010. 2807 - 2813.
- RODRIGUEZ, R. P. **Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos - Brasil, p. 195. 2010. Tese (Doutorado).

- RYAN, P.; FORBES, C.; COLLERAN, E. Investigation of the diversity of homoacetogenic bacteria in mesophilic and thermophilic anaerobic sludge using the formyltetrahydrofolate synthetase gene. **Water Sci. Technol.**, 57, n. 5. 675–680.
- SHEN, L.; BAGLEY, D. M.; LISS, S. N. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2009. 3689 - 3696.
- SIRIWONGRUNGSON, V.; ZENG, R. J.; ANGELIDAKI, I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. **Water Research**, 41, 2007. 4204-4210.
- SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Nashville, Tenn.: Archae Press., 1996.
- SUZUKI, Y. On hydrogen as fuel gas. **International Journal of Hydrogen Energy**, 7, 1982. 227-230.
- TAVARES, A. **Modelagem matemática da degradação da glicose, com produção de hidrogênio, em um reator de leito fixo**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. 2008. Dissertação (Mestrado).
- VAN GINKEL, S.; SUNG, S. W.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science & Technology**, 35, 2001. 4726-4730.
- WANG, J. L.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2009. 799-811.
- ZHANG, F. et al. Hydrogen supersaturation in thermophilic mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37, 2012. 17809 - 17816.
- ZHU, H. et al. Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. **Bioresource Technology**, 100, 2009. 5097-5102.